



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

***Escherichia coli* O157:H7 en hortalizas de fundos
agrícolas en la periferia de la ciudad de Lima – Perú**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Malena Desireé MUÑOZ AYALA

ASESOR

Carmen Rosa MÉNDEZ FARRO

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Muñoz M. *Escherichia coli* O157:H7 en hortalizas de fundos agrícolas en la periferia de la ciudad de Lima – Perú [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2017.

836



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA**

361
6(P)
53

Siendo las 11:00 hrs. del 26 de junio de 2017 se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por el Dr. Víctor Crispín Pérez e integrado por los siguientes miembros: Dra. María Elena Salazar Salvatierra, Mg. Carmen Rosa Méndez Farro (Asesora), Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz y la Mg. Mirtha Roque Alcarraz; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: "**Escherichia coli O157:H7 EN HORTALIZAS DE FUNDOS AGRÍCOLAS EN LA PERIFERIA DE LA CIUDAD DE LIMA-PERÚ**" presentado por la Bachiller en Ciencias Biológicas **MALENA DESIREÉ MUÑOZ AYALA**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Microbiología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

muy bueno, 18, Dieciocho

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Ciencias Biológicas **MALENA DESIREÉ MUÑOZ AYALA**, el Grado Académico de Magíster en **Microbiología**.

Siendo las 12:40 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 13:00 hrs. del 26 de junio de 2017.

Dr. Víctor Crispín Pérez (P.P., T.P.)
Presidente

Dra. María Elena Salazar Salvatierra (P.P. T.C.)
Miembro

Mg. Carmen Rosa Méndez Farro (P.P., T.C.)
Miembro - Asesora

Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz (P. Asoc., T.C.)
Miembro

Mg. Mirtha Roque Alcarraz (P. Asoc., T.C.)
Miembro

Observaciones:

Dedicatoria:

Dedicado a mis padres y familia

ÍNDICE

ÍNDICE	I
LISTA DE TABLAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Situación problemática	1
1.2. Formulación del problema	4
1.3. Justificación teórica	4
1.4. Justificación práctica	5
1.5. Objetivos	5
1.5.1. Objetivo General	5
1.5.2. Objetivos específicos	5
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	6
2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación.....	6
2.2. Antecedentes de Investigación.....	6
2.3. Bases Teóricas	10
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA.....	14
3.1. Tipo y Diseño de investigación.....	14
3.2. Unidad de análisis	14
3.3. Área de estudio	14
3.4. Muestra	15
3.5. Aislamiento de Coliformes por ICMSF.....	15
3.6. Aislamiento, caracterización y serotipificación de <i>E. coli</i> O157:H7 por FDA BAM.....	16
3.7. Determinación de los factores de Virulencia por PCR TR	17
3.7.1 Purificación del ADN.....	17
3.7.2 Detección de los factores de virulencia (eae, stx) mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real	18
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1 Resultados	19
4.2. Discusión.....	25
CONCLUSIONES	29

RECOMENDACIONES	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
ANEXOS	40
Anexo 1: Numeración de coliformes totales. ICMSF	40
Anexo 2: Numeración de coliformes fecales. ICMSF	41
Anexo 3: Numeración de <i>E.coli</i> ICMSF	42
Anexo 4: Detección de <i>E. coli</i> O157:H7 FDA/BAM	42
Anexo 5: Protocolo para purificación de ADN genómico de Bacterias Gram Negativas a partir de cultivo enriquecido “mericon DNA bacteria Kit”	44
Anexo 6: Protocolo la detección de los genes de virulencia asociados (eae, stx) Usando la técnica de PCR en Tiempo Real	46
Anexo 7: Factor de virulencia stx – canal verde	48
Anexo 8: Factor de virulencia eae – canal violeta	50
Anexo 9: Control Interno PCR – canal amarillo	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Cantidad de muestras por fundo recolectadas durante los meses de julio a diciembre del 2016.

Tabla 2: Resultados de los análisis de NMP para *E. coli* en hortalizas.

Tabla 3: Cantidad de muestras positivas serológicamente para *E. coli* O157:H7 del total de muestras analizadas.

Tabla 4: Resultados de serología y factores de virulencia de los análisis realizados para la identificación de *E. coli* O157:H7.

Tabla 5: Cantidad de muestras positivas y negativas de *E. coli* O157:H7 por fundo y matriz.

Tabla 6: Resultado de los factores de virulencia de *E. coli* O157:H7.

Tabla 7: Canales para el ensayo mericon *E. coli* O157 Screen Plus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Presencia y ausencia de *E. coli* en las muestras de hortalizas.

Figura 2: Presencia y ausencia de *E. coli* O157:H7 del total de 120 muestras distribuidas en cada fundo.

Figura 3: Porcentaje por fundo de las muestras positivas para *E. coli* O157:H7.

Figura 4: Resultado de *E. coli* O157:H7 por tipo de matriz.

RESUMEN

Escherichia coli coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera microbiota normal, en la actualidad se han descrito siete patotipos de *E. coli* productora de diarrea. La bacteria se puede aislar e identificar tradicionalmente con base en sus características bioquímicas o serológicas, el estudio de sus mecanismos de patogenicidad mediante ensayos en cultivos celulares o modelos animales y la presencia de genes que codifican factores de virulencia por PCR. La frecuencia de enfermedades producida por el consumo de hortalizas frescas contaminadas por *E. coli* O157:H7 se ha incrementado notablemente en el mundo debido a las malas condiciones higiénicas de manipulación y transporte. En el Perú existe una gran probabilidad que las hortalizas obtenidas directamente de los fundos agrícolas de la periferia de la ciudad de Lima estén contaminadas con *E. coli* O157:H7. El objetivo fue detectar la presencia y determinar la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en *Latuca sativa* (lechuga) y *Spinacea oleracea* (espinaca), obtenidas de fundos agrícolas de la periferia de la ciudad de Lima. Se analizaron 120 muestras de hortalizas, proveniente de 4 fundos de Lima; se utilizó la técnica del número más probable para la enumeración de *E. coli*, para la caracterización de *E. coli* O157:H7 se empleó el enriquecimiento selectivo, el análisis bioquímico y pruebas serológicas. Para determinar la presencia de los factores de virulencia shigatoxina (stx) e intimina (eaeA) se empleó el método de PCR en tiempo real. Para la entero hemolisina se realizó la prueba de hemólisis. Del total de muestras recolectadas (120), el 13,33 % (16) resultó positivo para *E. coli* O157:H7, el 1,67 % (2) presentó *E. coli* O157 no H7. De las 16 cepas (13,33 %) de *E. coli* O157:H7 se obtuvieron las siguientes secuencias de factores de virulencia: 3 (2,50 %) stx - / eaeA + y Hem - ; 8 (6,65 %) stx + / eaeA + y Hem - ; 2 (1,67 %) stx + / eaeA + y Hem + ; 2 (1,67 %) stx + / eaeA - y Hem - ; y 1 (0,83 %) stx - / eaeA + y Hem +. Así mismo el 86,67 % resultó negativo para *E. coli* O157:H7. El estudio reveló la presencia de *E. coli* O157:H7 con una prevalencia del 13,33 % en hortalizas de fundos agrícolas de la periferia de la ciudad de Lima.

Palabras Claves: *Escherichia coli* O157:H7, periferia de Lima, hortaliza, factores de virulencia.

ABSTRACT

Escherichia coli colonizes the man's intestine a few hours after birth and is considered microbiota, seven pathotypes of diarrhea-producing *E. coli* have now been described. The bacteria can be isolated and traditionally based on their biochemical or serological characteristics, the study of their mechanisms of pathogenicity by tests in cell cultures or animal models and the presence of genes that encode virulence factors by PCR. The frequency of diseases caused by the consumption of fresh vegetables contaminated by *E. coli* O157: H7 has increased significantly in the world due to the poor hygienic conditions of handling and transport. In Perú, there is a high probability that vegetables obtained directly from agricultural farms on the outskirts of the city of Lima are contaminated with *E. coli* O157: H7. The objective of this thesis was to detect the presence and to determine the prevalence of *E. coli* O157: H7 in *Latuca sativa* (lettuce) and *Spinacea oleracea* (spinach) obtained from agricultural funds in the outskirts of the city of Lima. A total of 120 samples of vegetables were analyzed, from four Lima backgrounds; for enumeration of *E. coli*, the most probable number technique was used by multiple tubes; for the characterization of *E. coli* O157:H7 selective enrichment, biochemical analysis and serological tests were used. The presence of the virulence factors shiga toxin (stx) and intimin (eaeA) was used in the real-time PCR method. Hemolysis test was performed for the whole hemolysin. Of the total samples collected (120), 13,33 % (16) was positive for *E. coli* O157:H7, 1,67 % (2) presented *E. coli* O157 no H7. Of the 16 strains (13,33 %) of *E. coli* O157:H7 the following virulence factor sequences were obtained: 3 (2,50 %) stx - / eaeA + and Hem -; 8 (6,65 %) stx + / eaeA + and Hem -; 2 (1,67 %) stx + / eaeA + and Hem +; 2 (1,67 %) stx + / eaeA - and Hem -; and 1 (0,83 %) stx - / eaeA + and Hem +. Likewise, 86,67 % were negative for *E. coli* O157:H7. The study revealed the presence of *E. coli* O157:H7 with a prevalence of 13,33 % in vegetables of agricultural backgrounds of the fringe of the city of Lima.

Key Words: *Escherichia coli* O157:H7, periphery of Lima, vegetables, virulence factors.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) constituyen un importante problema de salud pública a nivel mundial. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (Food and Agriculture Organization, FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han mostrado su preocupación por el aumento en la incidencia de estas enfermedades en las últimas décadas (ONU, 2004). Las ETAs son causa importante de la reducción en el crecimiento económico. En el Perú, así como en otros países en desarrollo, junto a la economía formal del estado, existe una economía informal, dentro de las cuales las actividades como la producción, comercialización y expendio de alimentos se realizan en forma incorrecta, lo que eleva el riesgo sanitario.

Los agentes patógenos, que incluyen bacterias, hongos, protozoos, virus y helmintos, presentes en las verduras frescas o mínimamente procesadas, representan una fuente importante de enfermedades para el ser humano (Steele & Odumeru, 2004; Tanata et al., 2004; Aruscavage et al., 2006).

Las ETAs son producidas por la ingestión de alimentos o agua, contaminados con agentes químicos o microbiológicos en tales cantidades que afecten la salud del consumidor a nivel individual o en grupos de población y que la contaminación puede deberse a la deficiencia en el proceso de elaboración, manipulación, conservación, transporte, distribución, comercialización y expendio de alimentos y agua (Ordoñez & Quezada, 2014). La producción de hortalizas tanto para consumo nacional como para la exportación han mostrado un importante crecimiento en muchos países latinoamericanos como Venezuela, México y Perú (Centurion & Takahara,

2004). A nivel mundial se producen anualmente 450 millones de toneladas de hortalizas, con un crecimiento del 3 % al año, por que el hombre en busca de prevenir enfermedades y preocupado por controlar su peso corporal, está adoptando cambios en su alimentación diaria, aumentando así el consumo de vegetales frescos y crudos, como son las hortalizas que se utilizan en ensaladas, las cuales acompañan diversos potajes que son consumidos masivamente por la población; destacando en el Lima el consumo de pollo a la brasa, parrillas, chicharrones y otros (Ferrato & Modino, 2008).

El consumo de hortalizas es vital para la salud humana puesto que son innumerables sus propiedades alimenticias, son fuente inagotable de vitaminas, minerales, fibra y energía (García et al., 2002). Sin embargo por sus características físicas y cultivo, algunos de estos productos están expuestos a contaminación de tipo biológico y químico, situación que genera un riesgo para la salud humana. Uno de los factores más importantes de contaminación microbiana para los cultivos son las aguas de riego empleadas con altos recuentos microbianos (Blumenthal et al., 2000; Pajares, 2004). Es importante reducir los niveles de vertidos y contaminación de los ríos. Sus aguas muestran lo que ocurre en las áreas terrestres a lo largo de los ríos expresando el fenómeno que llamamos contaminación y como consecuencia limitan o acondicionan la capacidad de uso. Las aguas contaminadas de estos ríos con la cual riegan las hortalizas se convierte en una fuente potencial de enfermedades que pueden transmitirse a través de ellas.

La frecuencia de brotes epidémicos de enfermedades asociadas al consumo de hortalizas frescas contaminadas con microorganismos entéricos se ha elevado notablemente en las últimas décadas, situación que se ha agravado con la presencia de bacterias patógenas que pueden producir complicaciones severas como el serotipo *E. coli* O157:H7, patógeno emergente que ha elevado significativamente su prevalencia. Se conoce que las hortalizas frescas son portadoras de elevadas cargas microbianas y que su contaminación incluye microorganismos de origen intestinal y ambiental

(OMS, 1998). La forma de consumo de las hortalizas puede servir como mecanismo de transmisión para una serie de microorganismos que producen daños a la salud del ser humano y por tanto se pueden convertir en responsables de ETAs (Beuchat, 1996). Aunque *E. coli* es una bacteria que habita en el intestino humano y de animales de sangre caliente y usualmente se comporta como comensal, en la última décadas han aparecido grupos que causan patologías diarreicas, denominadas *E. coli* diarreogénicas o *E. coli* patógenas. Las cepas patógenas poseen factores de virulencia que sumado al tipo de enfermedad que producen, han permitido agruparlas en patotipos (Nataro & Kaper, 1998).

En los Estados Unidos durante los años 2003-2012, se reportaron brotes de infecciones por *E. coli* O157 en pacientes, identificándose que el 65 % (255) de la transmisión fue por alimentos, el 10 % (39) fue por contacto persona a persona, el 10 % (39) fue por contacto directo o indirecto con animales, el 4% (15) a través del agua y el 11 % (42) no se logró determinar el modo de transmisión (Heiman et al, 2015).

E. coli enterohemorrágica (EHEC) de tipo O157:H7 es de gran importancia en la salud pública debido a su alta patogenicidad. Desde su identificación en 1983 se han detectado diversos brotes epidemiológicos en países desarrollados como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Japón y posteriormente en otros lugares del mundo. Esta variedad está asociada específicamente a carnes y productos cárnicos (hamburguesas y embutidos), a productos lácteos sin pasteurizar y aguas contaminadas; por lo que es importante realizar su detección (WHO, 2005).

Tradicionalmente la caracterización de *E. coli* diarrogénicas (DEC) se han realizado en base a los distintos serotipos y a sus factores de virulencia (Nataro, 1998). Debido al desarrollo de la biología molecular se han caracterizado los genes que codifican los factores de virulencia presentes en DEC, así tenemos: *invE* en EIEC (*E. coli* enteroinvasiva); *stx1* y *stx2* en EHEC (*E. coli* enterohemorrágica); *eaeA* en EPEC (*E. coli* enteropatógena);

lth y sth en ETEC (*E. coli* enterotoxigénica); aggR en EAEC (*E. coli* enteroagregativa) y daaC en DAEC (*E. coli* difusa adherente), entre otros (Nataro, 1998). Se han reportado brotes de diarreas por serotipo *E. coli* productores de toxina Shiga, vehiculizados por aguas de regadío con la subsecuente contaminación de alimentos (Watchtel et al., 2002). Así como también por agua de consumo, como la ocurrida en Estados Unidos de Norte América en 1998, que estuvo asociada al serotipo O157:H7 (Olsen, 2002). En el 2011 en Alemania, se presentó un brote con cuatro casos fatales donde estuvo implicado *E. coli* enteroagregativa serotipo O104:H4, productor de toxina “Shiga” (Scheutz et al., 2011).

Desde 1999, el Laboratorio de Referencia Regional de Tacna realiza el tamizaje rutinario para *E. coli* O157 en los aislamientos obtenidos de las muestras enviadas por los centros centinela, sin haber identificado casos, pero en el año 2001 se reportó el primer aislamiento de *E. coli* O157:H7, en nuestro país, un caso de diarrea disentérica ocasionado por *E. coli* O157:H7 productor de verotoxina en Tacna (Huapaya et al., 2001).

1.2. Formulación del problema.

¿*E. coli* O157:H7 se encuentra presente en muestras de *Latuca sativa* (lechuga) y *Spinacea oleracea* (espinaca), obtenidas de fundos agrícolas, de la periferia de la ciudad de Lima?

1.3. Justificación teórica.

E. coli O157:H7 es una bacteria patógena importante transmitida por alimentos que ocasiona cuadros de diarrea, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica (PTT) en humanos (Huapaya, 2001). En la última década, el incremento de brotes ocasionados por *E. coli* O157:H7 se asociaron con contaminación ambiental a través de productos frescos como hortalizas. Los factores intrínsecos (adaptación

genética) y extrínsecos pueden contribuir a la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en ambientes adversos. *E. coli* O157:H7 ha evolucionado en comportamientos y estrategias para persistir en el ambiente (Mohammed, 2013). Esto hace aún más difícil realizar la vigilancia de la seguridad de los alimentos. Por todo esto las verduras constituyen una fuente de microorganismos patógenos que pueden pasar a otros alimentos y contaminar las manos de los manipuladores, equipos y utensilios que utilizan durante su procesamiento, propiciando la contaminación cruzada consecuente y una mayor difusión de ETA (Muñoz, 2013).

1.4. Justificación práctica.

En nuestro medio, no contamos con reportes sobre estudios de vigilancia de *E. coli* O157:H7 en muestras de hortalizas obtenidas directamente de fundos agrícolas. Por lo tanto, es necesario examinar estas muestras en búsqueda de los mencionados organismos patógenos para el humano y resolver si *E. coli* O157:H7 son contaminantes de las hortalizas cultivadas en fundos de la periferia de la ciudad de Lima, hortalizas como lechugas y espinacas que son consumidas por los habitantes de la ciudad.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

Demostrar la presencia y detectar los factores de virulencia de *E. coli* O157:H7 en muestras de *Latuca sativa* (lechuga) y *Spinacea oleracea* (espinaca), obtenidas en 4 fundos agrícolas, de la periferia de la ciudad de Lima.

1.5.2. Objetivos específicos

- Demostrar la presencia de *E. coli* en muestras de *Latuca sativa* (lechuga) y *Spinacea oleracea* (espinaca).

- Demostrar la presencia de *E. coli* O157:H7 en muestras de *Latuca sativa* (lechuga) y *Spinacea oleracea* (espinaca).
- Detectar la presencia de factores de virulencia en las muestras positivas para *E. coli* O157:H7.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación.

El examen de las cuestiones como qué se comprende por ciencia, qué le hace diferenciarse de otras formas de conocimiento, constituye parte de los problemas que interesan a la filosofía. Algunas respuestas a estas indagaciones pueden contribuir para la interpretación y apropiación de relaciones significativas que van a explicar las realidades. Al asumirse la permeación multidisciplinar en el área de las ciencias de la salud, caracterizada por las interfases entre las ciencias naturales y sociales, más también por el mantenimiento y reproducción de una tradición discursiva y práctica que se pretende y legitima como la aplicación de conocimiento científico en el manejo de la enfermedad; reflexiones de orientación epistemológica pasan a hacer parte de la construcción histórica de esta área, estando presentes tanto en la salud colectiva, la llamada medicina social como una alternativa de análisis y comprensión de los conocimientos y de la práctica clínica (Barros da Silva & Delizoicov, 2008).

2.2. Antecedentes de Investigación:

Se estima que hay aproximadamente 76 millones de enfermedades, 325,000 hospitalizaciones y 5,200 muertes, siendo cada año atribuidos a brotes

transmitidos por los alimentos con un costo total de 10 a 83 billones de dólares americanos al año. Se han producido brotes que se extienden entre estados o incluso países, en la población mundial que espera producir productos frescos, productos orgánicos y alimentos exóticos. Esta tendencia se ha producido en la sociedad porque busca una dieta más sana que incluya más frutas y verduras, el deseo de productos frescos ha incrementado las enfermedades transmitidas por los alimentos. Los alimentos pueden contaminarse en cualquier momento de la granja a la mesa. La seguridad de los alimentos en algunos países son deficientes por el uso de aguas contaminadas con desechos humanos para el riego o el uso de estiércol como fertilizante, siendo el riesgo de contaminación mayor en el campo, durante el procesamiento inicial y en la manipulación del producto terminado. Las bacterias pueden persistir en las hortalizas tiempo después de la contaminación por el agua siendo los métodos de saneamiento ineficientes para eliminar el organismo (Bavaro, 2012). Situación que ha conducido a las autoridades sanitarias de la mayoría de países del mundo a considerarlas como un serio problema de salud pública (University of Maryland, 2002). Las hortalizas, incluyendo la lechuga, son reconocidas como vehículos potenciales para patógenos transmitidos por los alimentos tales como *E. coli* O157:H7. La lechuga fresca está potencialmente en alto riesgo de causar enfermedades transmitidas por los alimentos, ya que generalmente se consume sin cocinar (Pang et al., 2017).

La microbiota en las hortalizas frescas varía y refleja las condiciones del cultivo, la presencia de microorganismos patógenos afecta su inocuidad y constituye un problema para la salud humana. A nivel mundial se ha reportado el aislamiento de microorganismos patógenos en hortalizas como: rabanito, lechuga, espinaca, espárragos, apio, coliflor, culantro, col, perejil, etc. (Da silva et al., 2003; Martino et al., 2008; Mukherjee et al., 2004; Ribera et al., 2009).

Patógenos bacterianos como *Salmonella*, *Bacillus cereus*, *E. coli* O157:H7, *Clostridium botulinum*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Vibrio cholera*, *Aeromonas*,

Campylobacter jejuni y *L. monocytogenes* se aislaron con frecuencia de los productos frescos (Buck et al., 2003).

Los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos vinculados a los productos frescos son cada vez más frecuentes y generalizados. Los brotes de alto impacto, como el relacionado con la espinaca contaminada con *E. coli* O157:H7, resultaron en casi 200 casos de enfermedades transmitidas por alimentos en toda América del Norte y pérdidas de mercado de más de 300 millones de dólares americanos. Durante la última década ha habido una investigación intensiva para obtener una comprensión de las interacciones de los patógenos humanos con las plantas y cómo se puede mejorar la seguridad microbiológica de los productos frescos (Warriner et al., 2009).

En el año 2006, funcionarios del departamento de salud pública de un estado de los EE.UU. notificaron a los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de ese país un conglomerado de casos de infección por *E. coli* O157:H7. La FDA, el Estado de California, los CDC y el Departamento de Agricultura de los EE.UU. efectuaron una investigación sobre la procedencia del producto causante de la infección. En la investigación sobre la procedencia del producto contaminado se determinó que la fuente de la contaminación se encontraba en cuatro campos de cuatro ranchos diferentes. Aunque *E. coli* estaba presente en todos los ranchos, la cepa de *E. coli* O157:H7 causante del brote únicamente estaba presente en uno de ellos. Se analizaron muestras ambientales de los cuatro ranchos, con el fin de determinar cómo las heces del ganado bovino contaminaron las espinacas. Pese a que el foco de este brote se ha reducido a esos cuatro ranchos de los EE.UU., la historia de los brotes de *E. coli* O157:H7 ligados a hortalizas de hoja verde indica que es un problema mundial continuo. Sólo en los EE.UU. se han producido 19 brotes de enfermedad por *E. coli* O157:H7 transmitida por lechugas y hortalizas de hoja verde (OMS, 2007). En el 2010 Warriner and Namvar, reportaron 134 casos en Canadá, producto

de la contaminación de lechugas por *E. coli* O157:H7 (Warriner & Namvar, 2010).

Para el riego de las hortalizas, en el Perú y en los demás países de América Latina se usa con frecuencia aguas residuales domésticas crudas o diluidas con aguas superficiales, lo cual genera riesgos para la salud pública, en especial cuando se utilizan para cultivos de consumo directo que se ingieren sin cocinar como lechuga, rabanito y espinaca (Rivera et al., 2009); como se demostró en los reportes de brotes de diarrea generadas por *E. coli* shiga toxigénica transmitida por hortalizas especialmente lechugas regadas con aguas servidas. Frutas y hortalizas no requieren tratamiento adicional o son procesadas mínimamente y por lo general se comen crudas (Wachtel et al., 2002). En el 2012 se reportó que *E. coli* O157:H7, fue capaz de sobrevivir y crecer en diferentes tipos de hortalizas y frutas mínimamente procesadas (Abadías et al., 2012). En Febrero del año 2001 como parte del estudio transversal de los agentes etiológicos de diarrea aguda en la macro región sur del país, el laboratorio referencial de Tacna aisló una cepa procedente de una muestra de heces de un lactante de 11 meses de edad con un cuadro de diarrea disintérica, identificándola como *E. coli* O157. Esta cepa fue confirmada y caracterizada en el Instituto Nacional de Salud como *E. coli* O157:H7 toxina shiga tipo II, siendo el primer aislamiento reportado de *E. coli* enterohemorrágica en el Perú. (Huapaya et al., 2001).

En un estudio realizado en Cajamarca, se determinó el nivel de coliformes fecales y la frecuencia de *E. coli* en 85 muestras de hortalizas, obtenidas de manera aleatoria y expandidas en los principales mercados de Cajamarca. El 40 % de muestras presentaron coliformes fecales, con elevado número más probable por gramo (NMP/g) e importante frecuencia de *E. coli* en perejil y lechuga. El análisis reveló un alto nivel de contaminación fecal, un estado sanitario inaceptable y la necesidad de establecer medidas de control, frente al riesgo que esto representa para la salud (Rivera et al., 2009).

En un estudio realizado en cuatro mercados mayoristas de Lima, Perú: La Parada, Ramón Castilla, Ceres y Caquetá se reportó que el 18,9 % de verduras frescas de consumo crudo expendidas en mercados tenían niveles inaceptables de coliformes fecales (Muñoz et al., 2013); En un estudio de vigilancia de *E. coli* O157:H7 se demostró la presencia en un 2,4 % de lechugas obtenidas en los mercados (Guerrero et al., 2013). Las hortalizas que se consumen en Lima provienen en gran proporción de los terrenos agrícolas del este y sur de la ciudad y en muchos casos son regados por aguas superficiales contaminadas con aguas residuales domésticas. Las de mayor riesgo son las que se consumen crudas como lechuga, rabanito, espinaca (Vergaray et al., 2014).

E. coli O157:H7 es un patógeno de origen alimentario los niños son los más propensos a este microorganismo. El síndrome urémico hemolítico (HUS) causado por EHEC, conduce a la destrucción de los glóbulos rojos y la insuficiencia renal. Se atribuye a la virulencia de *E. coli* O157:H7 aunque en la mayoría de los casos, la infección es autolimitada en jóvenes niños y población envejecida y puede causar HUS. Por lo tanto en la actualidad, se realizan varias investigaciones para ofrecer terapias y vacunas eficaces, que pueden prevenir y tratar la infección en el tiempo apropiado (Saeedi et al., 2017).

2.3. Bases Teóricas:

El consumo de hortalizas es vital para la salud humana puesto que poseen innumerables propiedades alimenticias, son fuente inagotable de vitaminas, minerales, fibra y energía; sin embargo, por sus características físicas y de cultivo, algunos de estos productos están expuestos a contaminación de tipo biológico y químico, situación que genera un riesgo para la salud humana (García et al., 2002). Uno de los factores más importantes de contaminación microbiana para los cultivos son las aguas de riego empleadas con altos recuentos microbianos, como vertederos de aguas residuales en que se han

convertido los ríos, hecho verificado en la periferia de Cajamarca (Rivera et al., 2009). Siendo el agua de riego un importante factor de riesgo microbiano para las frutas y hortalizas (Tombini, 2017).

E. coli es una bacteria que se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y animales de sangre caliente. Debido a su elevada presencia en el tracto gastrointestinal y en las heces, la *E. coli* se utiliza como el indicador principal de contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad de los alimentos y el agua. La mayoría de las *E. coli* son organismos comensales inofensivos cuando se encuentran en su hábitat intestinal natural (FAO, 2011).

Los seres humanos pueden contraer una infección con cepas patógenas mediante el consumo de alimentos y agua directamente contaminados con heces o contaminados como consecuencia de la contaminación cruzada con otras fuentes alimentarias. Además, existe la posibilidad de contaminación a partir del contacto humano directo durante la preparación de los alimentos. La epidemiología de *E. coli* patógena transmitida por los alimentos varía a través del mundo. En comunidades con condiciones de higiene y saneamiento deficientes, las ETEC, EIEC y EPEC son prevalentes. Sin embargo, la *E. coli* patógena transmitida por los alimentos también ha aparecido en comunidades con sistemas de higiene y saneamiento mejor organizados (FAO, 2011).

E. coli fue descrita por primera vez en 1885 por Theodor Von Escherich, bacteriólogo alemán, quién la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *E. coli*. Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichia (Boop et al., 1999; Farmer, 1995).

Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera como microbiota normal, pero algunas cepas pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros

clínicos, entre ellos diarrea. Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que está conformado por antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O :H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (Mainil, 2013).

Los métodos de detección de EHEC en alimentos incluye los métodos tradicionales (cultivo e identificación bioquímica) así como la serotipificación con antisueros, dirigidos contra los antígenos somático (O) y flagelar (H), ensayos inmunológicos con pruebas comerciales (ELISA) con altos porcentajes de sensibilidad y especificidad y pruebas de biología molecular (PCR) para poner de manifiesto la presencia de fragmentos de genes involucrados en el mecanismo de patogenicidad y que sirvan de marcadores moleculares (Astuvilca, 2015).

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en siete patotipos: la enteropatógena (EPEC), la enterotoxigénica (ETEC), la enteroinvasiva (EIEC), la enterohemorrágica (EHEC), la enteroagregativa (EAEC), la adherente difusa (DAEC), la adherente invasora (AIEC) (Farfán et al., 2016). De ellas, EHEC ha cobrado gran importancia en salud pública (Huapaya et al., 2001).

EHEC produce una toxina denominada Shiga, característica de la bacteria, que ocasiona cuadros de diarrea, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica (PTT). *E. coli* O157:H7 es el prototipo de un grupo de más de 150 serotipos de *E. coli* que comparten el mismo potencial patogénico (Huapaya et al., 2001).

Se relacionó a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis

hemorrágica (CH) y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida. La bacteria aislada de todos los casos fue *E. coli* del serotipo O157:H7. Fue asociado con casos aislados de síndrome urémico hemolítico (SUH) caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre, con la presencia en heces de *E. coli* productora de una citotoxina con actividad en células Vero, por lo que se le llama verotoxina (VT), y a las cepas capaces de producirla se les denominó *E. coli* verotoxigénicas (VTEC). Además, se observó que la citotoxina se neutralizó con antitoxina obtenida a partir de *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo que también se le llamó "shiga-like toxin" o toxina semejante a shiga (SLT) o "shiga toxin" (STX), y a las *E. coli* capaces de producirla se les da el nombre de STEC (Farfán et al., 2016; Rodriguez, 2002).

Las *E. coli* productoras de toxinas shiga, consta de cepas de *E. coli* que producen una o más toxinas de la familia stx. La familia incluye stx1 y stx2 que es aproximadamente 57 % homóloga a stx1, tanto a nivel de nucleótidos y aminoácidos. Las stx1 y/o stx2, son el principal mecanismo de patogenicidad de *E. coli* O157:H7 junto con otros factores de virulencia. Sin embargo, otros 200 serotipos de EHEC no O157 también han sido identificados como productores de estas toxinas, en forma conjunta o separada (stx1 y/o stx2) y han estado involucrados en enfermedades diarreicas de humanos e incluso en cuadros de síndrome urémico hemolítico (Gyles, 2007).

Clasificaciones del grupo EHEC:

• Según factores de patogenicidad:

- i) Cepas típicas cuando tienen el fago, el plásmido de 60 MDa y presentan el fenómeno de A/E (Adherencia y Esfacelación) (Astuvilca, 2015).

- ii) Cepas atípicas, cuando no producen lesiones de A/E y pueden presentar o no el plásmido de 60 MDa (Astuvilca, 2015).

• **Según serología:**

- i) Cepas *E. coli* O157:H7, este serotipo no fermenta el D-sorbitol ni la ramnosa y no produce β -glucoronidasa; esta bacteria puede producir principalmente SUH y colitis hemorrágica (CH) (Astuvilca, 2015).
- ii) Cepas no-O157:H7, cuya frecuencia de aislamiento es cuatro veces mayor que las O157:H7 (Astuvilca, 2015).

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1. Tipo y Diseño de investigación.

La investigación es de tipo observacional-descriptivo.

3.2. Unidad de análisis

Hortalizas (lechugas y espinacas).

3.3. Área de estudio.

Se evaluaron cuatro fundos:

- Un fundo en Chuquitanta (FC) al Norte de Lima, en el Valle del Río Chillón.

- Dos fundos en Ñaña (FÑA y FÑB) en el distrito de San Juan de Lurigancho, al este de Lima.
- Un fundo en Lurín (FL) al sur de la ciudad de Lima, en el valle del río Lurín.

La identificación microbiológica se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos y Ambiental de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de julio 2016 a enero 2017, la genotipificación fue realizada en el laboratorio de la empresa Inmunochem S.A.C.

3.4. Muestra.

La selección de la muestra se realizó a través de un muestreo aleatorio simple. Se muestreó en total 120 hortalizas, 15 de cada especie por cada fundo evaluado (Fuentelsaz, 2004). Se recolectó 500 g de muestra, en bolsas plásticas de primer uso, selladas y etiquetadas; utilizando la indumentaria adecuada: mandil, toca, mascarilla y guantes. La conservación de las muestras estuvieron entre 0-4°C y transportadas al laboratorio en coolers provistos con gel refrigerante, antes de las 24 horas después de su recolección (MINSA/DIGESA, 2010).

3.5 Aislamiento de Coliformes por ICMSF

Para el aislamiento y enumeración de cepas de *E. coli* se utilizó la técnica del número más probable mediante tubos múltiples de la metodología del ICMSF (1996). Se aislaron inicialmente las bacterias coliformes totales utilizando 10 gr de muestra más 90 mL. de agua peptona se realizaron diluciones para la etapa presuntiva sembrando en caldo lauril sulfato incubando las muestras a 37°C por 24 a 48 h. Posteriormente se realiza la lectura de la siembra y se escogen los tubos con presencia de gas y turbidez

estos luego pasan a la etapa confirmativa en caldo brila y se incuban a 37°C por 24 a 48 h, se eligen los tubos con presencia de gas y turbidez y se realiza la lectura de la triada en la tabla de NMP/g (Anexo 1).

En paralelo a las prueba de coliformes totales se realiza la prueba para la identificación de coliformes fecales realizando la transferencia de una asada de los tubos con presencia de gas y turbidez del caldo lauril sulfato a caldo EC (*Escherichia coli*) se incubó a 44,5 °C por 24 a 48 h, los tubos positivos en esta etapa presentan presencia de gas y turbidez y se realizó la lectura en la tabla de NMP/g (Anexo 2).

Para el aislamiento de *E. coli* se realiza a partir de la siembra realizada en los tubos de caldo EC, los tubos positivos con presencia de gas y turbidez pasan a placas con agar EMB (Eosin Methylene Blue Agar) y se incuban a 35°C por 18 a 24 h se seleccionan las colonias sospechosas y se pasan a agar plate count (PCA) para ser incubadas a 35°C por 24 a 48 h las muestras positivas pasan a la identificación bioquímica siendo inoculadas en caldo triptonado (TB), caldo rojo de metilo (MRB), agar citrato de Simmons (SC) y caldo lauril sulfato (LSB) y son incubadas a 35°C por 24 a 48 h (Anexo 3).

3.6 Aislamiento, caracterización y serotipificación de *E. coli* O157:H7 por FDA BAM.

Para la caracterización y serotipificación de *E. coli* O157:H7 se utilizó la técnica de FDA BAM (FDA, 2013). Se realizó la etapa de enriquecimiento y la siembra, la primera licuando 25 gr de muestra en caldo EEB (Enterobacteria Enrichment Broth) suplementado con TSB (Caldo Tripticasa soya), con novobiocina más cefixime, cefsulodin y vancomicina luego con el EEB modificado se incubó a 37°C por 24h en agitación luego pasan a agar SMAC-TC (Mac Conkey sorbitol suplementado con telurito y cefixime). Se seleccionaron 10 colonias sospechosas de cada muestra por ser sorbitol

negativas; estas se siembran en agar TSAYE (tripticase soya con 0,6% de extracto de levadura) se incuban a 35°C por 24 h, luego pasan a agar EMB, las colonias de *E. coli* se aislaron y fueron sometidas a las pruebas bioquímicas de Indol, actividad B-glucoronidasa (MUG), TSI (Triple Sugar Iron), Simmons citrato, LIA (Lisine Iron Agar), Sorbitol, SIM (Sulfuro, Indol y motilidad). Posteriormente las colonias presuntivas se tipificaron con antisuero *E. coli* O157 y H7 Probac y se seleccionaron 5 a 7 colonias de cada muestra y se sembraron en agar Mac Conkey. (Anexo 4).

3.7 Determinación de los factores de Virulencia por PCR TR

Para la detección de los genes de virulencia la intimina *eae* y las shigatoxina se empleó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) en Tiempo Real, esta técnica conlleva dos etapas, la primera etapa es para la purificación del ADN (Qiagen, 2010) de bacterias Gram negativas a partir de medio de cultivo enriquecido y la segunda etapa es para la detección de los genes de virulencia (*eae*, *stx*).

3.7.1 Purificación del ADN

Se tomaron las muestras positivas del serotipo *E. coli* O157:H7 aisladas, luego se sometió a medio de cultivo enriquecido a 37°C por 24 horas, seguidamente se coloca 1 mL de cultivo enriquecido dentro de un tubo de microcentrifuga de 2 mL y se centrifugó a 13,000 x g por 5 minutos para obtener un pellet concentrado en el fondo del tubo, luego se descartó el sobrenadante usando una micropipeta, teniendo cuidado de no romper el pellet. Después se añadió 200 µL de solución tampón de lisis “Fast Lysis Buffer” al pellet bacteriano y se resuspendió usando un vortex hasta que la muestra quede nuevamente homogénea. Posteriormente se colocó el tubo de microcentrifuga en un termobloque con agitación (800 rpm) a 100°C por 10 minutos, se retiró la muestra y se dejó que llegue a temperatura ambiente

(15-25°C) por 2 minutos, luego se centrifugó el tubo a 13,000 x g por 5 minutos y se transfirió 100 µL de sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Se separó una alícuota para la reacción en cadena de la polimerasa y se guardó el resto del sobrenadante a -20°C. (Anexo 5).

3.7.2 Detección de los factores de virulencia (eae, stx) mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.

Para esta etapa se usaron reactivos y equipo de la marca QIAGEN específicos para la detección los genes de virulencia (eae, stx) “mericon® *E. coli* O157 Screen Plus Kit” y el equipo termociclador para PCR en tiempo real “Rotor Gene Q” (Qiagen, 2015).

Se preparó 10 µL de la mezcla maestra con un reactivo para PCR múltiple que contiene las sondas y cebadores específicos para los genes de virulencia (eae, stx) y se adicionó 10 µL de muestra problema. Se realizó la programación del equipo termociclador con una denaturación inicial de 95°C por 5 min, luego un ciclaje en tres pasos, en el primero paso se denatura a 95°C por 15 segundos el segundo paso es el de anclaje a 60°C por 15 segundos y un tercer paso de extensión a 72°C por 10 segundos, en esta última etapa del ciclaje se activaron los canales de detección del equipo termociclador, para la detección de los genes de virulencia stx se activó el canal verde que detectó la sonda FAM (isómero de fluoresceína), este ciclaje de tres pasos se repitió 40 veces, para la detección del control interno se activó el canal amarillo que detectó la sonda MAX NHS (fluorocromo mejorado) y para la detección del gen de virulencia eae se activó el canal magenta para detección de la sonda C (derivado de la cianina). Luego se analizaron los resultados arrojados por el equipo Rotor Gen Q (Anexo 6).

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

Entre los meses de julio a diciembre 2016, se recolectaron 120 muestras de hortalizas de cuatro fundos, uno al norte en Chuquitanta, dos al este en Ñaña y uno al sur en Lurín.

Tabla 1: Cantidad de muestras por fundo recolectadas durante los meses de julio a diciembre del 2016.

FUNDOS	NOMINACIÓN	MATRIZ	CANTIDAD
Fundo Chuquitanta (FC)	FC - LEC	Lechugas	15
	FC - ESP	Espinacas	15
Fundo ÑAÑA (FÑA)	FÑA - LEC	Lechugas	15
	FÑA - ESP	Espinacas	15
Fundo ÑAÑA (FÑB)	FÑB - LEC	Lechugas	15
	FÑB - ESP	Espinacas	15
Fundo Lurín (FL)	FL - LEC	Lechugas	15
	FL - ESP	Espinacas	15
Total de muestras:			120

De las 120 muestras, 60 corresponden a muestras de lechugas y 60 a muestras de espinacas (15 muestras por cada tipo de hortaliza y cada fundo), ver Tabla 1.

Tabla 2: Resultados de los análisis de NMP para *E. coli* en hortalizas.

	Número de Muestras	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
<i>E.coli</i> NTS #071 ($\geq 100\text{NMP/g}$)	12	10.00 %	44.17 %
<i>E.coli</i>	41	34.17 %	
No <i>E.coli</i> ($< 3\text{NMP/g}$)	67	55.83 %	55.83 %
Total	120	100.00 %	100.00 %

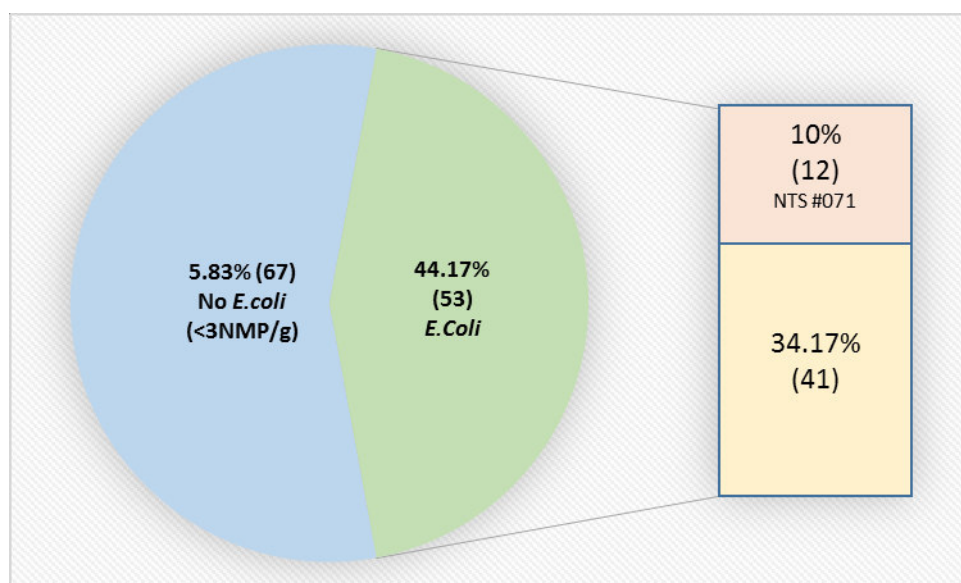


Figura 1: Presencia y ausencia de *E. coli* en las muestras de hortalizas.

De las 120 muestras de hortalizas recolectadas el 44,17 % (53) resultó positivo para *E. coli* y el 10 % (12) presentó un recuento igual o superior a 100 NMP/g, ver Tabla 2 y Figura 1.

Tabla 3: Cantidad de muestras positivas serológicamente para *E. coli* O157:H7 del total de muestras analizadas.

	# de Muestras	Porcentajes
<i>E. coli</i> O157 no H7	2	1.67 %
<i>E. coli</i> O157:H7	16	13.33 %
No <i>E. coli</i>	102	85.00 %
Total de muestras analizadas	120	100.00 %

Del total de muestras recolectadas (120), el 1,67 % (2) presentó *E. coli* O157 no H7, el 13,33 % (16) resultó positivo serológicamente para *E. coli* O157:H7, y de las 16 muestras positivas para *E. coli* O157:H7 presentaron colonias Indol (+), actividad B-glucoronidasa (MUG)-, TSI (Triple Sugar Iron) A/A (Acidez en la superficie/Acidez en fondo) gas +, Simmons citrato (-), LIA (Lisyne Iron Agar) (K/K), Sorbitol (-), SIM (Sulfuro -, Indol + y motilidad +). También podemos evidenciar que el 2,5 % (3) resultaron positivas para la prueba de hemolisis (alfa hemolisis), ver Tabla 3 y Tabla 4.

Tabla 4: Resultados de serología y factores de virulencia de los análisis realizados para la identificación de *E. coli* O157:H7.

				FDA BAM	PCR TR KIT		Hemólisis
				Serología	Factores virulencia		
Tipo de E.coli	Fundo	Tipo	Muestras(18)	O157:H7	stx	eae	Hem
<i>E.coli</i> O157:H7	FÑA	LEC	FÑA - LEC10	+	-	+	-
<i>E.coli</i> O157:H7	FÑA	LEC	FÑA - LEC 11	+	+	+	-
<i>E.coli</i> O157:H7 (**)	FÑA	LEC	FÑA - LEC 12	+	+	+	+
<i>E.coli</i> O157:H7	FÑA	ESP	FÑA - ESP 07	+	+	+	-
<i>E.coli</i> O157:H7	FÑA	ESP	FÑA - ESP 08	+	+	-	-
<i>E.coli</i> O157:H7	FÑA	ESP	FÑA - ESP 09	+	-	+	+
<i>E.coli</i> O157:H7	FÑB	LEC	FÑB - LEC 06	+	+	+	-
<i>E.coli</i> O157:H7	FÑB	LEC	FÑB - LEC 07	+	+	+	-
<i>E.coli</i> O157:H7	FÑB	LEC	FÑB - LEC 08	+	+	+	-
<i>E.coli</i> O157:H7	FÑB	LEC	FÑB - LEC 10	+	+	-	-
<i>E.coli</i> O157:H7	FÑB	ESP	FÑB - ESP 04	+	+	+	-
<i>E.coli</i> O157:H7	FÑB	ESP	FÑB - ESP 06	+	+	+	-
<i>E.coli</i> O157:H7	FÑB	ESP	FÑB - ESP 08	+	+	+	-
<i>E.coli</i> O157:H7	FÑB	ESP	FÑB - ESP 09	+	-	+	-
<i>E.coli</i> O157:H7	FÑB	ESP	FÑB - ESP 11	+	-	+	-
<i>E.coli</i> O157 no H7 (*)	FC	LEC	FC - LEC 05	+	-	-	-
<i>E.coli</i> O157 no H7 (*)	FC	LEC	FC - LEC 06	+	-	-	-
<i>E.coli</i> O157:H7 (**)	FL	ESP	FL - ESP 01	+	+	+	+

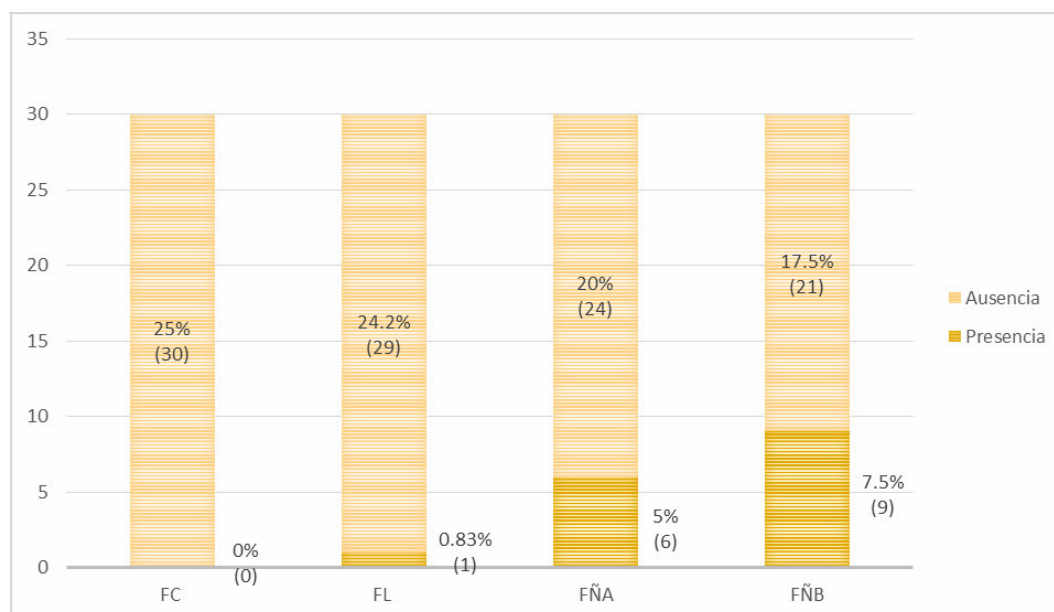


Figura 2: Presencia y ausencia de *E. coli* O157:H7 del total de 120 muestras distribuidas en cada fundo.

De las 120 muestras de hortalizas el 1,67 % (2) fueron positivas para *E. coli* O157 no H7 (*) que pertenece al Fundo Chuquitanta (FC), el 0,83 % (1) dió positivo y es altamente patogénica al presentar todos los factores de virulencia (**) para *E. coli* O157:H7 que pertenece al Fundo Lurín (FL); el 5 % (6) fue positivo para *E. coli* O157:H7 que pertenece al Fundo Ñaña A (FÑA) de los cuales el 0,83 % (1) resultó ser también altamente patogénica (**); el 7,5 % (9) nos dió positivo para *E. coli* O157:H7 que pertenece al Fundo Ñaña B (FÑB), ver Tabla 4, Figura 2 y Tabla 5.

De las 16 muestras positivas para *E. coli* O157:H7 el 56 % pertenecen al Fundo Ñaña B , 0 % al Fundo Chuquitanta , 6 % al Fundo Lurín y 38 % al Fundo Ñaña A, ver Figura 3.

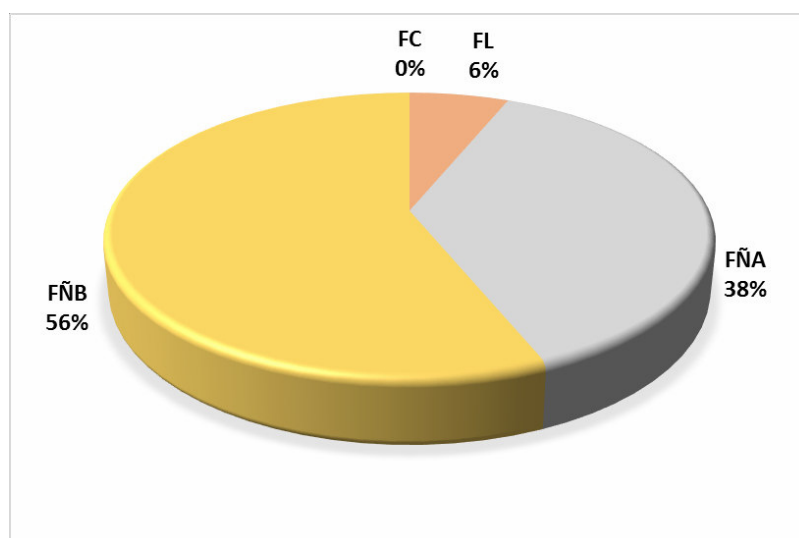


Figura 3: Porcentaje por fundo de las muestras positivas para *E. coli* O157:H7.

De las 16 muestras positivas para *E. coli* O157:H7, el 44 % (7) representa las muestras positivas de lechuga y el 56 % (9) muestras positivas de espinaca, ver Figura 4.

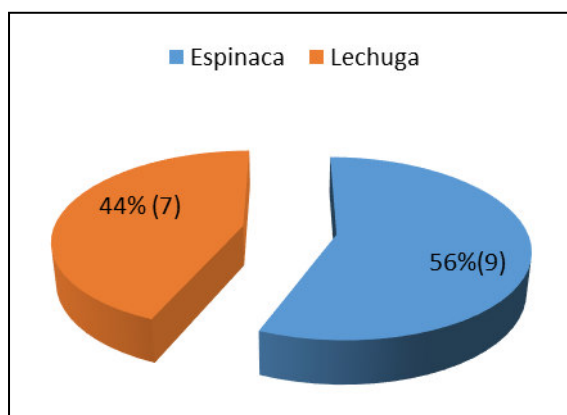


Figura 4: Resultado de *E. coli* O157:H7 por tipo de matriz.

De 60 muestras de espinaca recolectadas el 15 % nos dió positivo para *E. coli* O157:H7 y de 60 muestras de lechuga recolectadas el 12 % nos dió positivo para *E. coli* O157:H7 véase Figura 5.

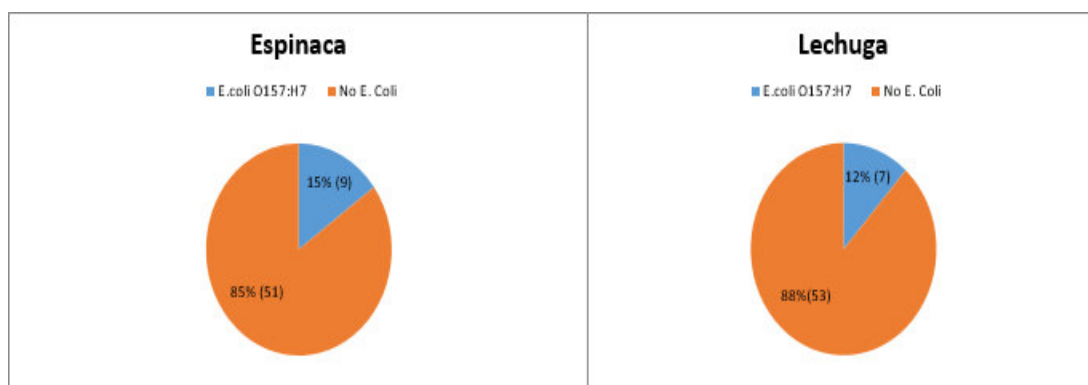


Figura 5: Porcentaje positivo para *E. coli* O157:H7 lechugas y espinacas

De 120 muestras recolectadas siendo 30 muestras para cada fundo, nos dió *E. coli* O157:H7 el 0% fue para Fundo Chuquitanta, el 3,33 % para el Fundo Lurín, el 20 % para el Fundo Ñaña A, el 30 % para el Fundo Ñaña B, ver tabla 5.

Tabla 5: Cantidad de muestras positivas y negativas de *E. coli* O157:H7 por fundo y matriz.

	Muestras Positivas	Muestras Negativas	Muestras Totales	% por Fundo	% del Total (120)
FC	0 lechugas 0 espinacas	30	30	0.00 %	0.00 %
FL	0 lechugas 1 espinacas	29	30	3.33 %	0.83 %
FÑA	3 lechugas 3 espinacas	24	30	20.00 %	5.00 %
FNB	4 lechugas 5 espinacas	21	30	30.00 %	7.50 %
Totales	16	104	120	53.33 %	13.33 %

Tabla 6: Resultado de los factores de virulencia de *E. coli* O157:H7.

Factores virulencia		Hemólisis	Cantidad	% sobre 120 muestras
stx (*)	eae (**)	Hem		
-	+	-	3	2.50 %
+	+	-	8	6.67 %
+	+	+	2	1.67 %
+	-	-	2	1.67 %
-	+	+	1	0.83 %

(*)stx (Toxina Shiga) / (**) eae (intimina).

De las 120 muestras de hortalizas se obtuvieron 16 cepas (13.33 %) de *E. coli* O157:H7 de los que se obtuvieron las siguientes secuencias de factores de virulencia: 3 (2.50 %) stx - / eaeA + y Hem - ; 8 (6.65 %) stx +/- eaeA + y Hem - ; 2 (1.67 %) stx + / eaeA + y Hem + ; 2 (1.67 %) stx + / eaeA - y Hem - ; y 1 (0.83 %) stx - / eaeA + y Hem +. Así mismo el 86.67 % resultó negativo para *E. coli* O157:H7, ver Tabla 4 y Tabla 6.

Tabla 7: Canales para el ensayo mericon *E. coli* O157 Screen Plus.

	Canal Verde FAM (495/250 nm)	Canal Violeta Cy5.5 (685/707 nm)	Canal Amarillo MAX NHS Ester (524/557 nm)
Ensayo mericon <i>E. coli</i> O157 Screen Plus	stx	eae	Control Interno

Para la detección de los factores de virulencia para la intimina (eae) y las shigatoxina (stx) se empleó la técnica del PCR TR a través del Kit de Mericon *E. coli* O157 Screen Plus Kit, ver Tablas 4, 7 y Anexos 7, 8 y 9.

4.2. Discusión.

Las investigaciones epidemiológicas han implicado al alimento y al agua como vehículo más común para las infecciones causadas por *E. coli* O157:H7. El cual se ha aislado de las aguas superficiales y puede sobrevivir durante muchas semanas en este tipo de ambientes *E. coli* O157:H7 puede entrar en la planta de lechuga a través del sistema radicular y migrar a través de la porción comestible de la planta. Existe un riesgo evidente de infección por *E. coli* O157:H7 por contaminación de cultivos de frutas y hortalizas cultivadas en suelos que se consumen con un procesamiento mínimo. El serotipo *E. coli* O157:H7 se ha asociado con grandes brotes de origen alimentario en Norteamérica, Europa y Japón (Adamu et al., 2014).

Uno de los factores más importantes de contaminación microbiana para los cultivos son las aguas de riego, empleadas con altos recuentos microbianos tal como lo determinamos con la presencia de *E. coli* en las muestras de hortalizas estudiadas, con una prevalencia del 44,17 % y del 10 % de muestras que presentaron un recuento mayor al límite (≥ 100 NMP/g) para *E. coli* en las muestras de lechuga y espinaca, según la Norma Técnica Sanitaria N° 71 del MINSA-DIGESA en el ítem XIV.1 para frutas y hortalizas

frescas (sin tratamiento). La literatura señala como principal fuente de contaminación de las hortalizas, al estiércol utilizado como fertilizante y el agua del riego sin tratamiento o contaminado (Tanata et al., 2004) y como se demuestra en un estudio realizado en cuatro granjas durante un año (julio de 2014 a agosto de 2015) en Brasil, donde se reportó la prevalencia de *E. coli* del 84,8 % y 38,3 % en las muestras de agua de riego y en las lechugas, respectivamente, lo que indica que el agua de riego es una importante fuente de contaminación de las lechugas (Tombini et al., 2017). Se menciona la prolongada supervivencia de bacterias en estiércol, *E. coli* O157:H7 durante 21 días (Puig et al., 2014). A su vez en el 2015 se reporta la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en agua residual contaminada con materia fecal por un periodo de dos meses (Saxena et al., 2015).

También se ha señalado como posible fuente de contaminación el uso de pesticidas reconstituido con agua contaminada durante el cultivo (Guan, 2005). Otro factor de contaminación está dado por la presencia de animales domésticos y silvestres en el campo (perros, gatos, ganado bovino), fueron los más frecuentes en las áreas de cultivo. Es importante tener en cuenta que la presencia de animales y de poblaciones en los alrededores constituye una fuente de contaminación directa tanto por el arrastre de los canales de regadío como el traslado de los contaminantes por los animales y los propios lugareños.

En nuestro país las ocurrencias de *E. coli* O157:H7 en hortalizas recolectadas directamente de fundos agrícolas son raramente encontradas en la literatura siendo comúnmente los reportes directamente relacionados con los brotes en salud pública. Como lo manifestado en el reporte en el que realizó el primer aislamiento de *E. coli* O157:H7 en el Perú a partir de un lactante de 11 meses de edad (Huapaya et al., 2001); El presente estudio reveló la presencia de *E. coli* O157:H7 con una prevalencia del 13,33 % en las muestras de hortalizas analizadas (120); de las cuales las muestras de lechugas (60) nos dio un valor de 11,67 % para *E. coli* O157:H7 y de las muestras de espinacas (60) nos dio un valor de 15 % para *E. coli* O157:H7.

Resultados que contrastan con los obtenidos por Reuben y Makut, en la ciudad de Lafia Nigeria en los que reportan que el 30% de espinacas estaban contaminadas con *E. coli* O157:H7 (Reuben & Makut, 2014); siendo la tasa de incidencia más elevada que la que estamos dando a conocer en el presente estudio, esto puede deberse a las condiciones sanitarias del agua de riego y del ganado presente en los alrededores considerando que gran parte de las muestras fueron recolectadas de granjas, además las condiciones del transporte insalubres hacia a los mercados (Reuben, 2014) a diferencia de nuestro estudio que las muestras fueron recolectadas de fundos agrícolas con presencia de ganado y poblaciones en los alrededores.

En el 2002 se reportó un 4 % de hortalizas con *E. coli* O157:H7 en Perú (León, 2002) y en el 2013 se reportó en Perú un 2,4 % de muestras de lechugas contaminadas por *E. coli* O157:H7 (Guerrero et al., 2013). Esta diferencia puede estar asociada a la procedencia de las muestras de lechuga que fueron colectadas directamente de los mercados recibiendo un previo tratamiento de lavado para ser expendido en dichos lugares, a diferencia de las muestras recolectadas directamente de fundos agrícolas en el presente estudio.

De las 16 cepas aisladas para *E. coli* O157:H7, dos cepas presentaron todos los factores de virulencia característicos para una *E. coli* entero hemorrágica considerándose como cepas altamente patógenas, es importante recalcar que la categoría patogénica está definida únicamente por la presencia de factores de virulencia de la bacteria que están codificados por islas de patogenicidad cromosómica, cromosomas de fagos integrados en el genoma bacteriano así como plásmidos (Adamu et al., 2014) y que las pruebas bioquímicas como la fermentación del sorbitol y las pruebas serológicas deben ser complementadas dado que algunos casos no correlacionan. Por tal motivo que las pruebas concluyentes para la detección de *E. coli* entero hemorrágica son el cultivo celular o la detección del gen que codifica la toxina Shiga y otros factores de virulencia típicos de EHEC mediante la reacción en cadena de la polimerasa PCR (Huget et al., 2002). El resto de

cepas serológicamente positivas para *E. coli* O157:H7 solo presentaron uno o dos factores de virulencia que también fueron consideradas como *E. coli* O157:H7. Al estar presentes los genes que codifican los factores de virulencia en fagos y plásmidos pueden adquirirse o perderse (Mendez et al., 2013).

Así mismo considerando lo descrito anteriormente las dos cepas positivas para *E. coli* O157 no H7 puedan haber portado en algún momento el gen de la toxina Shiga y los otros factores de virulencia y posteriormente haberlo perdido (Feng et al., 2001).

CONCLUSIONES

1. Se determinó la presencia de *E. coli* en 44,17 % de las muestras de hortalizas estudiadas, 20,83 % de las muestras de lechugas y 23,33 % en las muestras de espinacas.
2. Se determinó la presencia de *E. coli* O157:H7 por serología y prueba moleculares en 13,33 % de las muestras de hortalizas estudiadas, 7,5 % en las muestras de espinacas y 5,83 % en las muestras de lechugas, obtenidas de fundos agrícolas de la periferia de la ciudad de Lima.
3. Se determinó que 13,33 % de las cepas aisladas de *E. coli* O157:H7 presentaron factores de virulencia, con las siguientes secuencias: 3 (2.50 %): stx - / eaeA + y Hem - ; 8 (6.65 %): stx +/- eaeA + y Hem - ; 2 (1.67 %): stx + / eaeA + y Hem + ; 2 (1.67 %): stx + / eaeA - y Hem - ; y 1 (0.83 %): stx - / eaeA + y Hem +.

RECOMENDACIONES

Se recomienda implementar un programa de vigilancia epidemiológica que nos permita establecer la prevalencia de la infección por *E. coli* O157:H7 en la ciudad de Lima; considerando todos los alimentos susceptibles de ser vehículos de transmisión como las hortalizas y las carnes de bovino. Ello permitirá implantar políticas de higiene sanitaria para evitar la diseminación de esta bacteria patogénica emergente tomando en consideración que es ampliamente difundida en el mundo y que puede en un futuro cercano ser un problema de salud pública en el Perú.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadias, M., Alegre, I., Oliveira, M., Altisent, R. & Viñas, I. (2012). Growth potential of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut fruits (melon and pineapple) and vegetables (carrot and escarole) stored under different conditions. *Food Control* 27, 37-44.
- Adamu, M., Shamsul, B., Desa M. & Khairani-Bejo S. (2014). A Review on *Escherichia coli* O157:H7 The Super Pathogen. *Health and the Environment Journal*. 5(2), 78-93.
- Aruscavage, D., Lee, K., Miller, S. & LeJeune, JT. (2006). Interactions affecting the proliferation and control of human pathogens on edible plants. *J Food Sci*. 71, 89-99.
- Astuvilca, C. (2015). Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en canales bovinas de camales de Lima. (Tesis). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Barros da Silva, W. & Delizoicov, D. (2008). Reflexiones epistemológicas en las Ciencias de la salud. *Humanidades Médicas*. 8, 2-3.
- Bavaro, M. (2012). *E. coli* O157:H7 and Other Toxigenic Strains: The Curse of Global Food Distribution. *Curr Gastroenterol Rep*. 14, 317–323.
- Beuchat, L. (1996). Pathogenic microorganisms associated with fresh produces. *Journal of Food Protection*. 59(2), 115-216.
- Blumenthal, UJ., Mara, DD., Peasey, A., Ruiz, G. & Stott, R. (2000). Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in agricultura: Recommendations for revising WHO guidelines. *Bull World Health Organ*. 78(9), 1104-16.

Boop, CA. Brenner, FW. Wells, JG. & Strockbine, N. (1999). *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. Manual of clinical microbiology. (7), 459-474.

Buck, J., Walcott, R. & Beuchat L. (2003). Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. *The American Phytopathological-Society*.
<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/MicroSafety.aspx>.

Centurion, M. & Takahara, M. (2004). Determinación de la incidencia de *Listeria monocytogenes* en pollos frescos y verduras frescas obtenidas en mercados y centros de abastecimiento de Lima Metropolitana (Tesis). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/1108/1/Centurion_pm.pdf

Da Silva, V., Silvara, N., Yokoya, F., & Okasaki, M. (2003). Ocorrencia de *Escherichia coli* O157:H7 em vengetais e resistencia aos agentes de Desinfeccao de verduras. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 23(2), 167-173.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura – División de Producción y Sanidad Animal. (2011). *Escherichia coli*: Examen de la *Escherichia coli* como patógeno emergente transmitido por los alimentos. *Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales*. 39, 20-27.
<http://www.fao.org/docrep/015/i2530s/i2530s00.pdf>.

Farfán, A., Ariza, S., Vargas, F. & Vargas, L. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Chilena Infectología*. 33 (4), 438-450.

- Farmer, JJ. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. (1995) *Manual of clinical microbiology*. (6), 440.
- FDA Bacteriological analytical manual. (2002). Diarrheagenic *Escherichia coli*, Chapter 4A. (8), *Rev. A. AOAC International*, Gaithersburg, MD.
- Feng, P., Dey, M., Abe, A. & Takeda, T. (2001) Isogenic Strain of *Escherichia coli* O157:H7 That Has Lost both Shiga Toxin 1 and 2 Genes. *Clinical Diagnostics Laboratory Immunology*. 8(4); 711-717.
- Ferrato, J. & Mondino, M. (2008). Producción, Consumo y Comercialización de Hortalizas en el Mundo. Universidad Nacional de Rosario, Buenos Aires.
<http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/24/4AM24.htm>.
- Fuentelsaz C. (2004). Cálculo del tamaño de la muestra. *Matronas Profesión*. 5(18), 5-1.
- García, R., Chavez, J., Mejía, A. & Durán de Bazua, C. (2002). Microbiological determinations of some vegetables from the Xochimilco zone in Mexico City. *Revista Latinoamericana Microbiología*, 44(1), 24-30.
- Guan, TT., Blank, G. & Holley, RA. (2005). Survival of pathogenic bacteria in pesticide solutions and on treated tomato plants. *J Food Prot*. 68(2), 296-304.
- Guerrero, C., Guillén, A., & Rojas, R. (2013). Vigilancia de *Escherichia coli* O157:H7 en alimentos y aguas. *Catedra Villareal*. 1(1), 35-45.

- Gyles CL. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *Journal of Animal Science*, 85(13), 45–62.
- Heiman, K., Mody, R., Johnson, S., Griffin P. & Gould, L. (2015). *Escherichia coli* O157 Outbreaks in the United States, 2003–2012. *Emerging Infectious Diseases*. 21(8), 1293-1301.
- Huapaya, B., Huguet, J., Suárez, V., Torres, Y., Montoya, I., & Salazar, E. (2001). Primer aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 18, 1-2.
- Huguet, J., Huapaya, B. & Salazar, E. (2002). Determinación de factores de virulencia asociados a *Escherichia coli* enterohemorrágica en cepas peruanas aisladas entre 1999-2001. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 19(2), 63-67.
- ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications For Foods. (1996). Intestinally pathogenic *Escherichia coli*. En *Microorganisms in Foods 5: Characteristics of microbial pathogens*. 126-140.
- León, S. (2002). Prevalencia de *Escherichia coli* O157:H7 en carne de vacuno, queso fresco y verduras expendidos en los mercados de Lima metropolitana y condiciones higiénico sanitarias asociadas a su ocurrencia. Lima-Perú. 2000-2001. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú
- Martino, T., Lemus, D., Leyva, V., Tejedor, R., De los Reyes, M., & Soto, P. (2008). Incidencia de *Listeria* spp en vegetales frescos. *Revista Cubana de Salud Pública*. 34(4), 1-10.
- Mainil, J. (2013) *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 152, 2– 12.

- Méndez, C., Vergaray, G., Morante, H., Flores P. & Gamboa, R. (2013). Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de carne molida de bovino en Lima-Perú. *Rev. Perú. biol.* 20(2), 159 – 164.
- MINSA/DIGESA (2010). Directiva Sanitaria N°032 V.01 Procedimiento para la Recepción de Muestras de Alimentos y Bebidas de Consumo Humano en el Laboratorio de Control Ambiental de la Dirección General de Salud Ambiental del Ministerio de Salud. Directiva Sanitaria N° 032 - MINSA/DIGESA - V.01.
- Mohammed, S., Paquin-Veillette, J., Dozois, Ch. & Harel, J. (2013). The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett.* 341, 1–12.
- Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E. & Diez-Gonzales, F. (2004). Preharvest Evaluation Coliformes. *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and Conventional Produce grow by Minnesota Framers. *Journal of Food Protection.* 67(5), 894-900.
- Muñoz, S., Vilca, M., Ramos, D. & Lucas, J. (2013). Frecuencia de enterobacterias en verduras frescas de consumo crudo expendidos en cuatro mercados de Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.* 24(3), 300-306.
- Nataro, J. & Kaper, J. (1998) Diarrheagenic *Esherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews.* 11(1), 142-201.
- Olsen, S., McKee, G., Fox, K., Bibb, W. & Mead, PA. (2002). Waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic Syndrome: implications for rural water systems. *Emerging Infectious Diseases.* 8(4),780-786.

OMS: Organización Mundial de la Salud. (1998). Surface Decontamination of Fruits and Vegetables Eaten Raw: a Review. Ginebra. FoodSafetyIssues.FOS/98.2.

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64435/1/WHO_FSF_FOS_98.2.pdf.

OMS: Organización Mundial de la Salud. (2007). Brote de *Escherichia coli* O157:H7 en espinacas. Nota informativa de INFOSAN No. 01/2007 - *E.coli* en espinacas.1-5.

http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_01_spinach_Feb06_sp.pdf.

ONU: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Organización Mundial de la Salud. (2004). Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo: resumen interpretativo. Serie de evaluación de riesgos microbiológicos No. 4. Roma: FAO/OMS. 53. ftp://ftp.fao.org/es/esn/jemra/mra4_es.pdf.

Ordóñez, L. & Quezada, H. (2014) Guía técnica para la investigación y control de brotes de enfermedad transmitida por alimentos. (41)-7 MINSA. <http://www.dge.gob.pe/normas/2014/RM683-2014-MINSA.pdf>.

Pajares, C. (2004). Impacto de la actividad humana y agropecuaria en la calidad sanitaria del agua del río Porcón (Cajamarca). Tesis de maestría Escuela de Post Grado, Universidad nacional de Cajamarca.

Pang, H., Lambertini, E., Buchanan, R., Schaffner, D. & Pradhan, A. (2017). Quantitative Microbial Risk Assessment for *Escherichia coli*

O157:H7 in Fresh-Cut Lettuce. *Journal of Food Protection*. 80 (2), 302-311.

Puig, Y., Leyva, V., Rodríguez, A., Carrera, J., Molejón, P., Pérez, Y. & Dueñas, O. (2014). Calidad microbiológica de las hortalizas y factores asociados a la contaminación en áreas de cultivo en La Habana. *Revista habana ciencias médicas*. 13(1), 111-119.

Qiagen. mericon dna Bacteria Handbook, mericon DNA Bacteria Kit, mericon DNA Bacteria Plus Kit. For extraction of DNA from Gram-negative and Gram-positive bacteria, 2010; 1-20. <http://www.qiagen.com>.

Qiagen. mericon® *E. coli* O157 screen plus kit handbook. For detection of *Escherichia coli* serotype O157 and the *E. coli* associated virulence genes eae, stx1, and stx2, in food or animal feed samples using real-time PCR on the Rotor-Gene Q, 2015; 1-36. Recuperado de <http://www.qiagen.com>.

Reuben, CR. & Makut, MD. (2014). Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in vegetables grown and sold in Lafia metropolis, Nigeria. *World Journal of Microbiology*. 1(3), 17-21

Rivera, M., Rodriguez, C. & Lopez, J. (2009). Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 26(1), 45-48.

Rodriguez,G, (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia Coli*. *Salud pública de México*. 44 (5), 465-475. <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v44n5/14036.pdf>.

- Scheutz, F., Nielsen, EM., Frimodt-Møller, J., Boisen, N., Morabito, S., Tozzoli, R., Nataro, JP., & Caprioli, A. (2011). Characteristics of the enteroagregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Eurosurveillance*. 16,24
- Saeedi, P., Yazdanparast, M., Behzadi, E., Salmanian, A., Mousavi, S., Nazarian, S. & Amani, J. A review on strategies for decreasing *E. coli* O157:H7 risk in animals (2017). *Microbial Pathogenesis*. 103, 186-195.
- Saxena, T., Kaushik, P. & Krishna, M. (2015). Prevalence of *E. coli* O157:H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 82, 249–264.
- Steele, M. & Odumeru, J. (2004). Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *J Food Prot*. 67(12), 2839-2849.
- Tananta, I., Chavez, A. & Casas, E. (2004). Presencia de enteroparasitos en lechuga (*Latuca sativa*) en establecimientos de consumo público de alimentos en el mercado de Lima. *Rev Inv Vet Perú*. 15, 157-162.
- Tombini, L., Sopena, L., Titze, C., Fosch A., Allende, A. & Tondo, E. (2017). Microbial quality of irrigation water used in leafy green production in Southern Brazil and its relationship with produce safety. *Food Microbiology* 65,105-113.

University of Maryland. (2002). Mejorando la seguridad y calidad de frutas y Hortalizas frescas: *Manual de formación para Instructores*. http://www.jifsan.umd.edu./pdfs/gaps_espa%C3%B1ol/secci-n-v-pdf.

Vergaray, G., Méndez, CR., Gamboa, R. & Fuentes, E. (2014). Indicadores entéricos en aguas de regadío y su relación con lechugas y rabanitos cultivados en Lima- Perú. Congreso Internacional de Inocuidad de los Alimentos. 275.

Wachtel, M., Whitehand, L. & Mandrell, R. (2002). Association of *E. coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *Journal of Food Protection*. 65(1), 18-25.

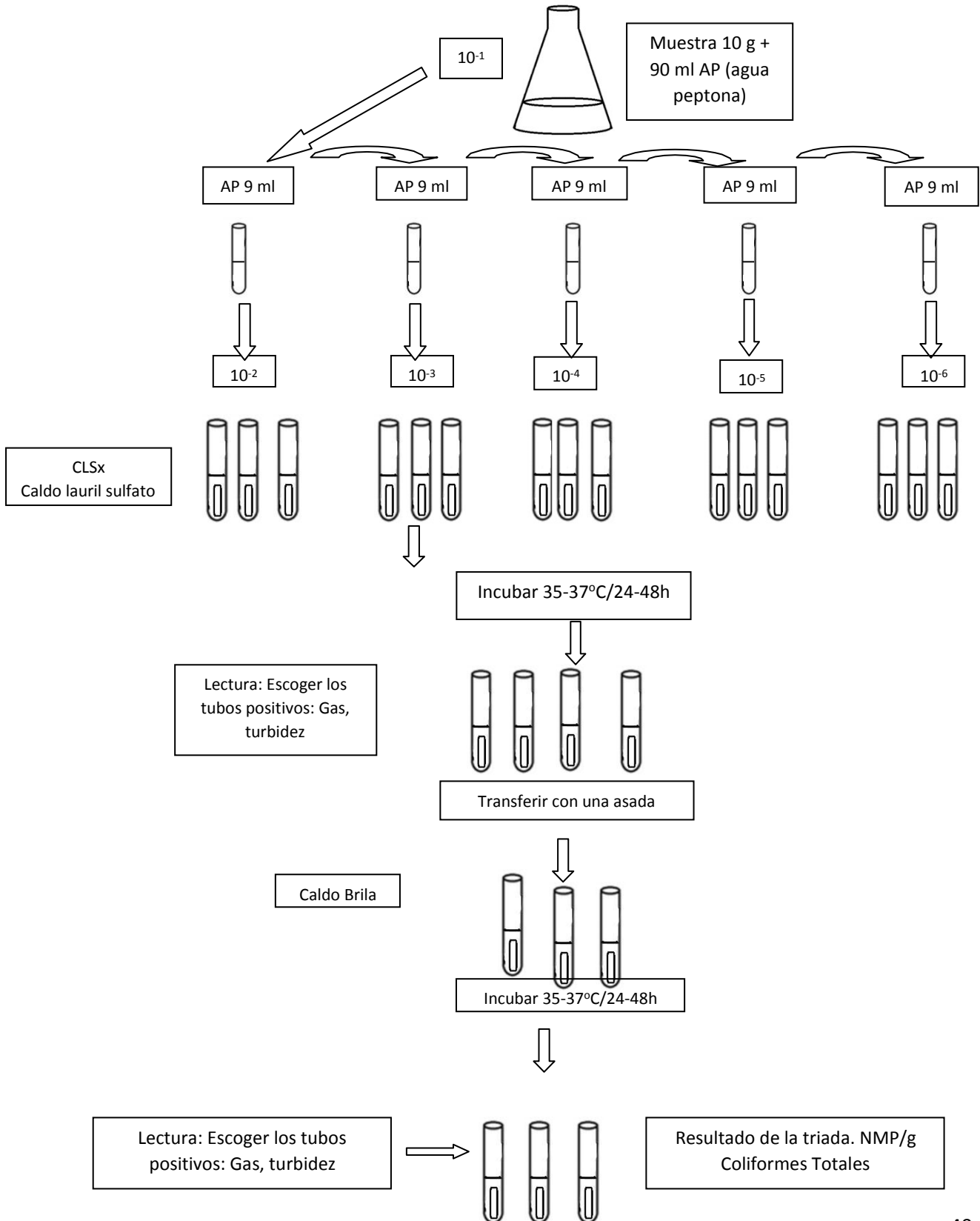
Warriner, K., Huber, A., Namvar, A., Fan, W. & Dunfield, K. (2009). Recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. *Food and Nutrition Research* 57, 155-208.

Warriner, K. & Namvar, A. (2010). The tricks learnt by human enteric pathogens from phytopathogens to persist within the plant environment. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 131-136.

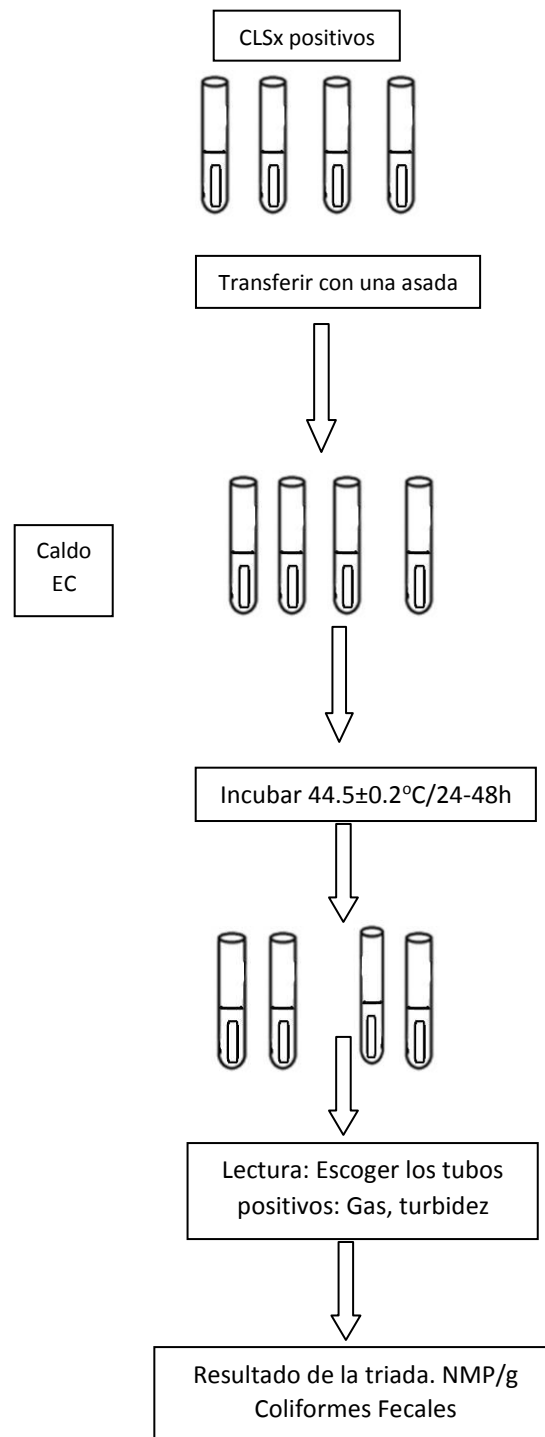
World Health Organization (WHO), (2005). Emerging Food Borne diseases. Mayo 2005 Fact sheet N°125. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>.

ANEXOS

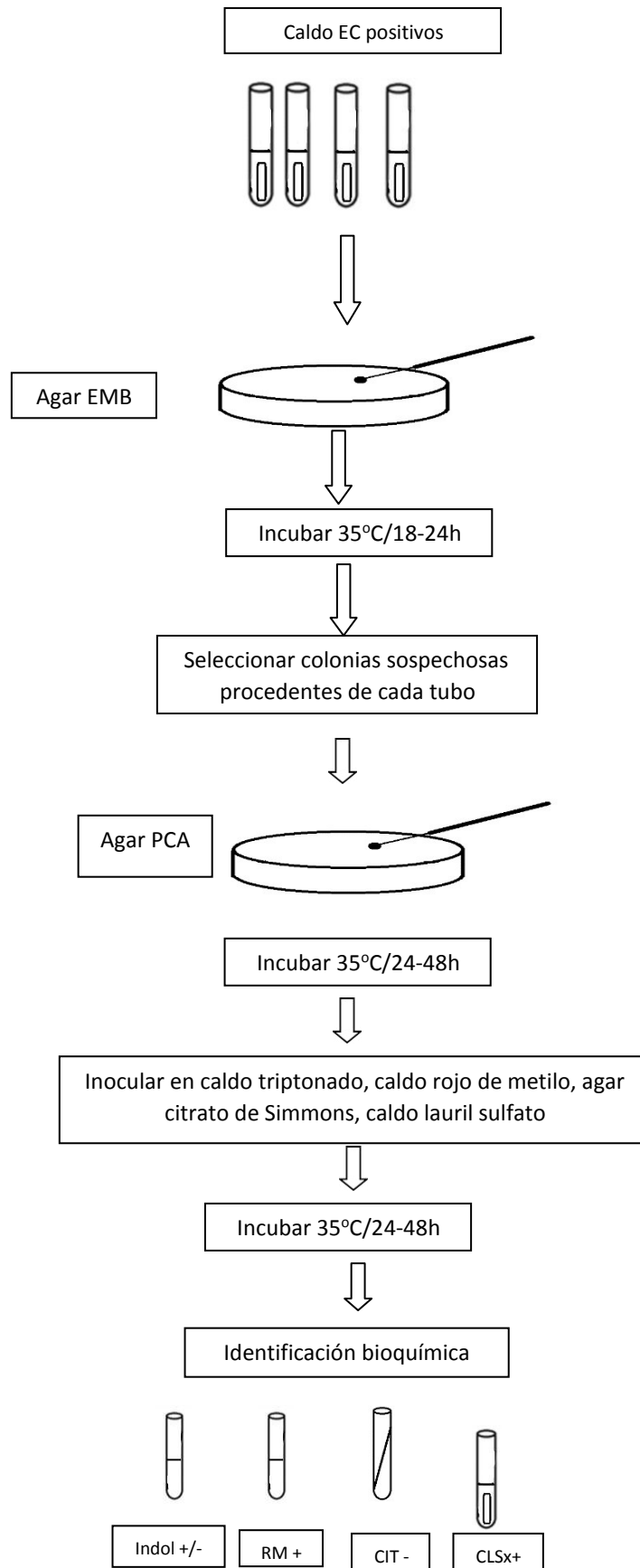
Anexo 1: Numeración de coliformes totales. ICMSF.



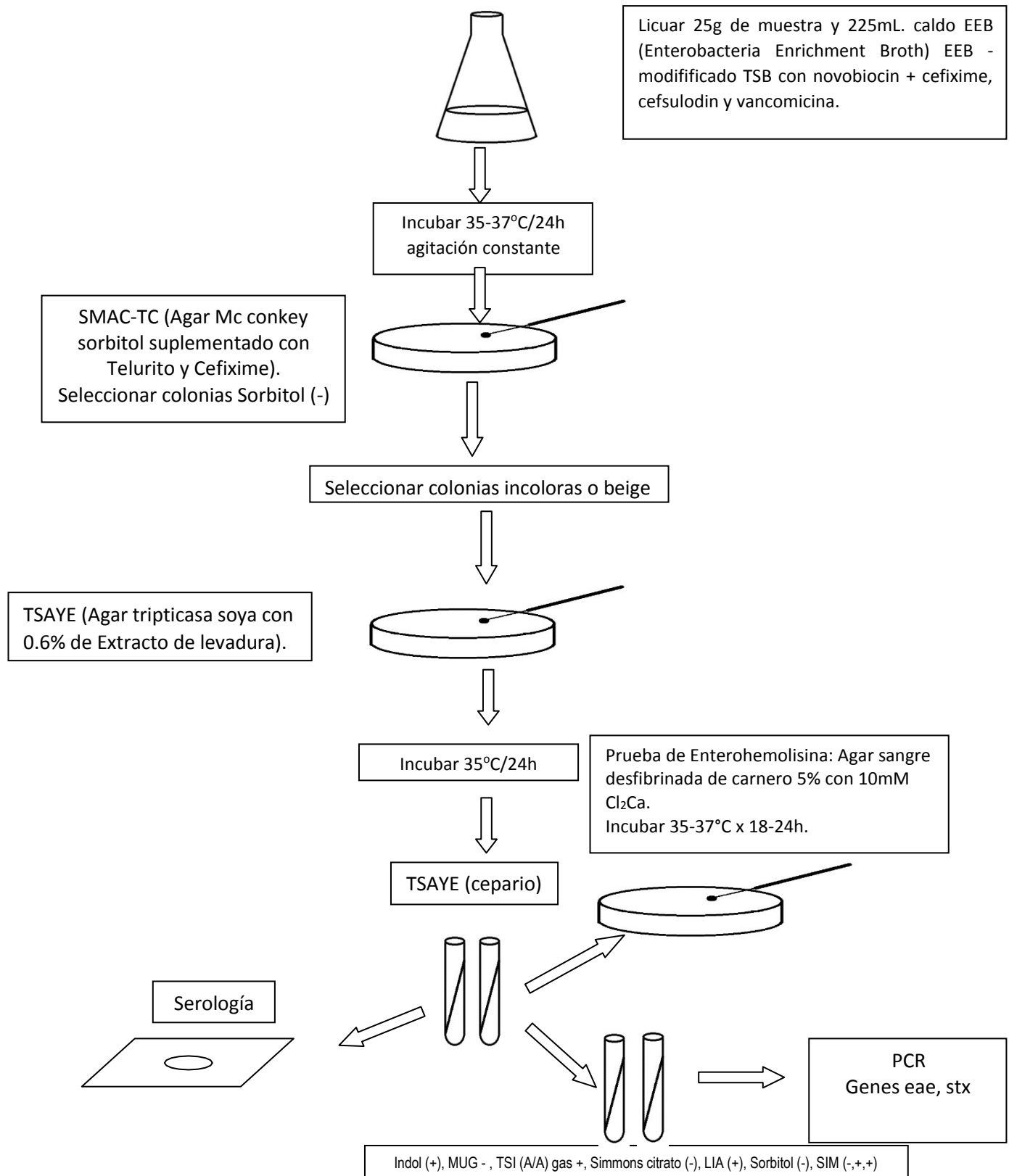
Anexo 2: Numeración de coliformes fecales. ICMSF.



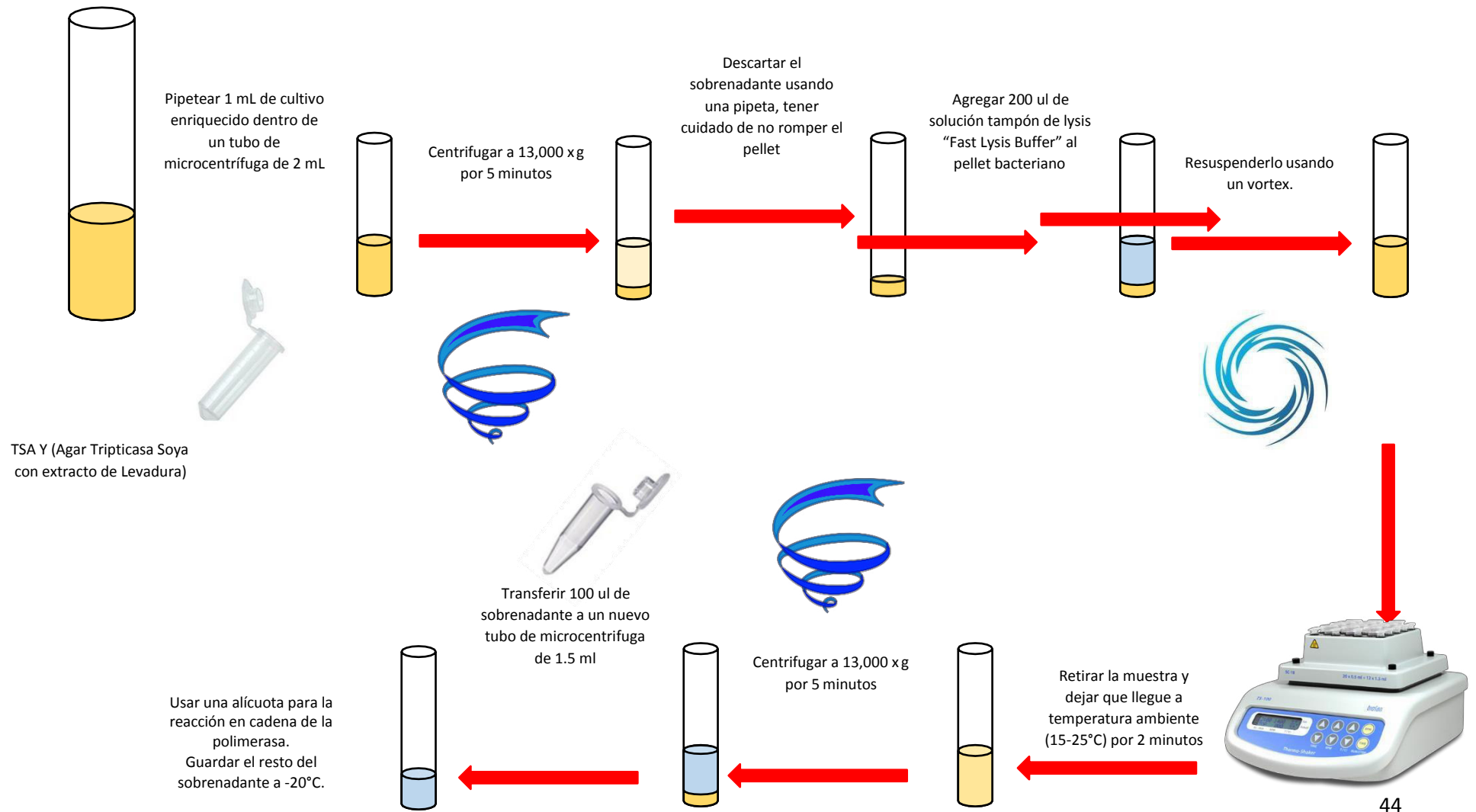
Anexo 3: Numeración de *E.coli*. ICMSF



Anexo 4: Detección de *E. coli* O157:H7. FDA/BAM.

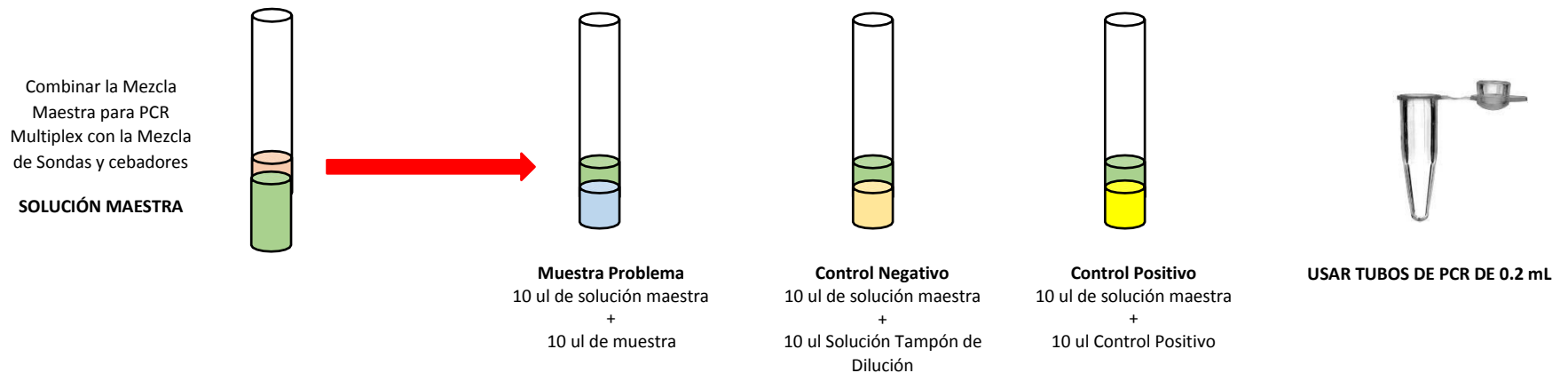


Anexo 5: Protocolo para purificación de ADN genómico de Bacterias Gram Negativas a partir de cultivo enriquecido
“mericon DNA bacteria Kit”



1. Pipetear 1 mL de cultivo enriquecido dentro de un tubo de microcentrífuga de 2 mL y centrifugar a 13,000 x g por 5m.
2. Descartar el sobrenadante usando una pipeta, tener cuidado de no romper el pellet.
3. Agregar 200 ul de solución tampón de lysis “Fast Lysis Buffer” al pellet bacteriano, resuspenderlo usando un vortex.
4. Colocar el tubo de microcentrífuga en un termobloque con agitación (800 rpm) a 100°C por 10 minutos.
5. Retirar la muestra y dejar que llegue a temperatura ambiente (15-25°C) por 2 minutos.
6. Centrifugar el tubo a 13,000 x g por 5 minutos.
7. Transferir 100 ul de sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
8. Usar una alícuota para la reacción en cadena de la polimerasa.
9. Guardar el resto del sobrenadante a -20°C.

Anexo 6: Protocolo la detección de los genes de virulencia asociados (eae, stx) Usando la técnica de PCR en Tiempo Real



Programar el Equipo
Termociclador en
Tiempo Real

“Rotor Gene Q”



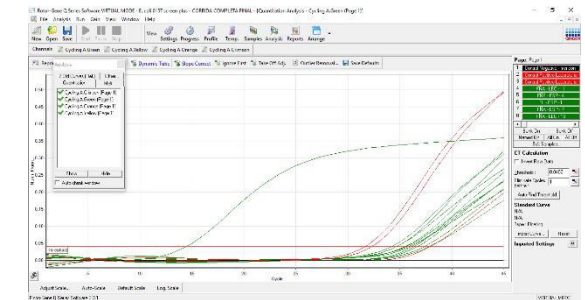
Protocolo de Ciclaje

Denaturación Inicial de 95°C/5 min

Ciclaje de tres pasos (40 veces)

- Denaturación de 95°C/15 seg.
- Anclaje de 60°C/15 seg.
- Extensión de 72°C/10 seg.

**Activar en el anclaje los canales verde,
amarillo, violeta.**



ANALIZAR LOS RESULTADOS

Contenido del Kit

- Un Tubo con la mezcla de sondas y cebadores para la detección de los genes de virulencia asociados (eae, stx).
- Un tubo con Control Positivo
- Un tubo con una solución tampón para dilución
- Agua libre de RNasas
- Solución maestra para un PCR multiplex.

Anexo 7: Factor de virulencia stx – canal verde.



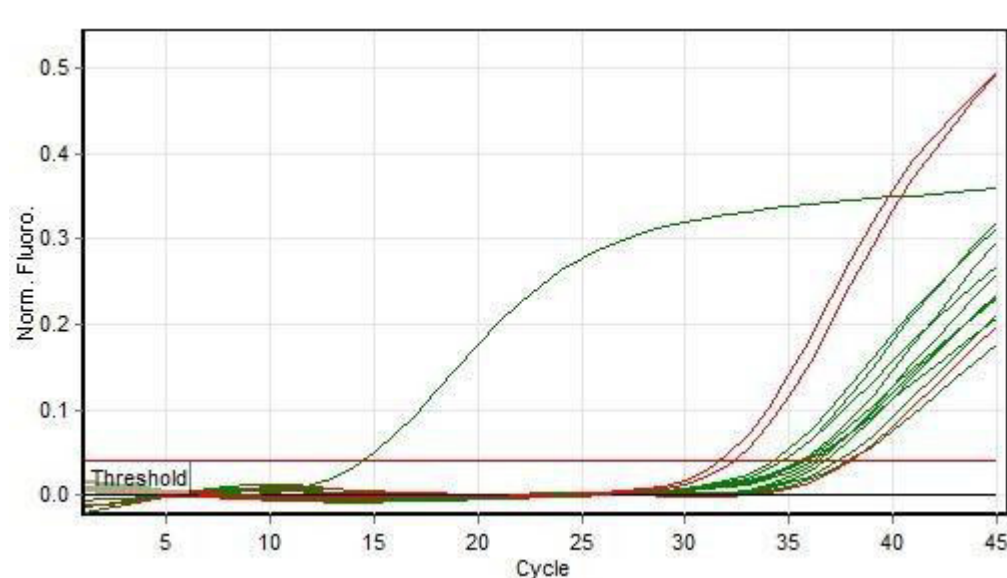
www.qiagen.com


























Quantitation Report

Experiment Information

Run Name	<i>E. coli</i> O157 screen plus - CORRIDA COMPLETA FINAL
Run Start	20/12/2016 2:55:29 p. m.
Run Finish	20/12/2016 4:23:15 p. m.
Operator	DGGP
Notes	
Run On Software Versión	Rotor-Gene Q Software 2.3.1.49
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	5.
Gain Yellow	5.
Gain Orange	5.
Gain Crimson	7.
Machine Serial No.	0316115

Quantitation data for Cycling A.Green



No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment
1		Control Negativo - mericon E.coli O157 Plus Kit	Negative Control		NEG (NTC)
2		Control Positivo Laboratorio 1	Positive Control	30.3	
3		Control Positivo Laboratorio 2	Positive Control	29.1	
4		FÑA - LEC - 11	Unknown	35.82	
5		FÑB - ESP - 4	Unknown	36.08	
6		FL - ESP - 1	Unknown	34.71	
7		FÑA - ESP - 7	Unknown	35.62	
8		FÑA - LEC - 10	Unknown		NEG (NTC)
9		FÑA - ESP - 8	Unknown	34.72	
10		FÑB - ESP - 6	Unknown	37.38	
11		FÑB - LEC - 8	Unknown	34.23	
12		FÑB - LEC - 10	Unknown	35.57	
13		FÑB - LEC - 6	Unknown	37.88	
14		FÑB - LEC - 7	Unknown	36.70	
15		Control Positivo 1:1000000	Positive Control	37.97	
16		FÑA - LEC - 12	Unknown	36.38	
17		FÑA - ESP - 9	Unknown		NEG (NTC)
18		FÑB - ESP - 8	Unknown	14.48	
19		FÑB - ESP - 9	Unknown		NEG (NTC)
20		FÑB - ESP - 11	Unknown		NEG (NTC)
21		FC - LEC - 5	Unknown		NEG (NTC)
22		FC - LEC - 6	Unknown		NEG (NTC)
23		Control Negativo Laboratorio	Negative Control		NEG (NTC)
24		Control Positivo 1:1000000	Positive Control	31.69	
25		Control Positivo 1:1000000	Positive Control	32.33	

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold. /NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report was generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 (Build 49)
Copyright ©2013 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.

Anexo 8: Factor de virulencia eae – canal violeta.



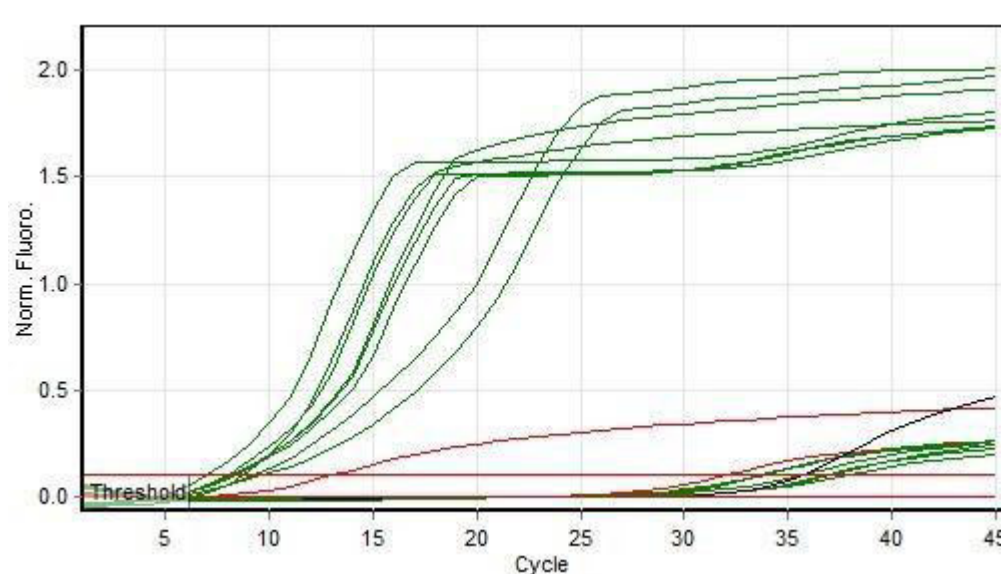
www.qiagen.com


























Quantitation Report

Experiment Information

Run Name	<i>E. coli</i> O157 screen plus - CORRIDA COMPLETA FINAL
Run Start	20/12/2016 2:55:29 p. m.
Run Finish	20/12/2016 4:23:15 p. m.
Operator	DGGP
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.1.49
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	5.
Gain Yellow	5.
Gain Orange	5.
Gain Crimson	7.
Machine Serial No.	0316115

Quantitation data for Cycling A.Crimson



No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment
1		Control Negativo - mericon E.coli O157 Plus Kit	Negative Control		NEG (NTC)
2		Control Positivo Laboratorio 1	Positive Control	13.07	
3		Control Positivo Laboratorio 2	Positive Control	31.94	
4		FÑA - LEC - 11	Unknown	33.53	
5		FÑB - ESP - 4	Unknown	35.52	
6		FL - ESP - 1	Unknown	8.27	
7		FÑA - ESP - 7	Unknown	7.87	
8		FÑA - LEC - 10	Unknown	37.66	
9		FÑA - ESP - 8	Unknown		NEG (NTC)
10		FÑB - ESP - 6	Unknown	36.86	
11		FÑB - LEC - 8	Unknown	8.17	
12		FÑB - LEC - 10	Unknown		NEG (NTC)
13		FÑB - LEC - 6	Unknown	33.84	
14		FÑB - LEC - 7	Unknown	7.00	
15		Control Positivo 1:1000000	Positive Control	35.65	
16		FÑA - LEC - 12	Unknown	36.92	
17		FÑA - ESP - 9	Unknown	8.13	
18		FÑB - ESP - 8	Unknown	9.68	
19		FÑB - ESP - 9	Unknown	8.72	
20		FÑB - ESP - 11	Unknown	9.23	
21		FC - LEC - 5	Unknown		NEG (NTC)
22		FC - LEC - 6	Unknown		NEG (NTC)
23		Control Negativo Laboratorio	Negative Control		NEG (NTC)
24		Control Positivo 1:1000000	Positive Control	32.48	
25		Control Positivo 1:1000000	Positive Control	34.02	

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report was generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 (Build 49)

Copyright ©2013 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.

Anexo 9: Control Interno PCR – canal amarillo.



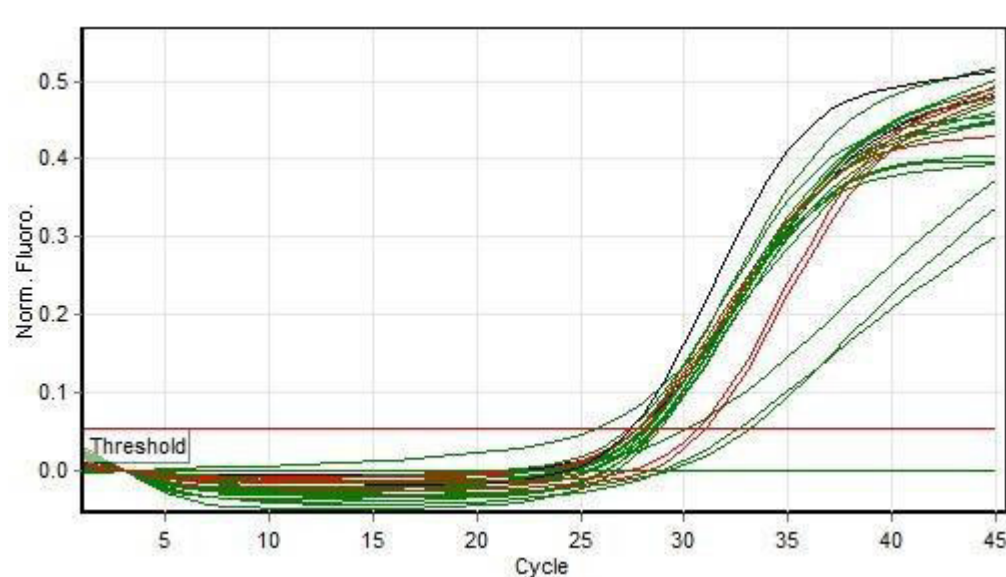
www.qiagen.com




















Quantitation Report

Experiment Information

Run Name	<i>E. coli</i> O157 screen plus - CORRIDA COMPLETA FINAL
Run Start	20/12/2016 2:55:29 p. m.
Run Finish	20/12/2016 4:23:15 p. m.
Operator	DGGP
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.1.49
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	5.
Gain Yellow	5.
Gain Orange	5.
Gain Crimson	7.
Machine Serial No.	0316115

Quantitation data for Cycling A.Yellow



No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment
1		Control Negativo - mericon E.coli O157 Plus Kit	Negative Control	27.90	
2		Control Positivo Laboratorio 1	Positive Control	27.84	
		Control Positivo Laboratorio 2	Positive Control	27.80	
4		FÑA - LEC - 11	Unknown	28.31	
5		FÑB - ESP - 4	Unknown	28.54	
6		FL - ESP - 1	Unknown	28.67	
7		FÑA - ESP - 7	Unknown	28.91	
8		FÑA - LEC - 10	Unknown	27.78	
9		FÑA - ESP - 8	Unknown	32.64	
10		FÑB - ESP - 6	Unknown	28.50	
11		FÑB - LEC - 8	Unknown	28.60	
12		FÑB - LEC - 10	Unknown	27.45	
13		FÑB - LEC - 6	Unknown	28.06	
14		FÑB - LEC - 7	Unknown	28.74	
15		Control Positivo 1:1000000	Positive Control	27.80	
16		FÑA - LEC - 12	Unknown	28.16	
17		FÑA - ESP - 9	Unknown	28.20	
18		FÑB - ESP - 8	Unknown	30.25	
19		FÑB - ESP - 9	Unknown	27.46	
20		FÑB - ESP - 11	Unknown	33.15	
21		FC - LEC - 5	Unknown	25.12	
22		FC - LEC - 6	Unknown	27.08	
23		Control Negativo Laboratorio	Negative Control	28.70	
24		Control Positivo 1:1000000	Positive Control	31.06	
25		Control Positivo 1:1000000	Positive Control	30.71	

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report was generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 (Build 49)

Copyright ©2013 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved